# A PROCESS FOR THE PREPARATION OF LIPASE

Publication number: JP7504561T

Publication date:

1995-05-25

Inventor: Applicant: Classification:

- international:

C12N15/09; C07K14/21; C12N1/21; C12N9/20; C12N15/00; C12N15/55; C12P19/38; C12R1/07;

C12R1/19; C12R1/38; C12N15/09; C07K14/195; C12N;

C12N1/21; C12N9/18; C12N15/00; C12N15/55; C12P19/00; (IPC1-7): C12N15/09; C12N1/21; C12N9/20; C12P19/38; C12N15/09; C12R1/07; C12N1/21; C12R1/19; C12N9/20; C12R1/38

- European:

C07K14/21; C12N9/20

Application number: JP19920510426D 19921218

Priority number(s): WO1992DK00391 19921218; WO1991DK00402

19911220

Also published as:

WO9313200 (A EP0681609 (A1 US5681715 (A1 F1942907 (A) EP0681609 (A0

Report a data error he

Abstract not available for JP7504561T

Abstract of corresponding document: WO9313200

A process for producing an active lipase enzyme in vitro, comprising mixing an inactive or partly active lipase enzyme with a chaperone molecule and subjecting the mixture to denaturation followed by renaturation to produce the active lipase enzyme.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

			,
			,
0 4			
5			
Į.			
A E			
9			
1			
3			
1			
*			
§			
*			
Section 4			
Í			
9			
4			
ACCESS OF THE PERSON OF THE PE			
4			
3			
ें भू			
Sept.			
***			
3			
1			
<b>X</b>			
-			
3			
1			
and the second			
3			
1			
3			
and the second			
Service Control			
No.			
Sec. Sec.			
1			
*			
a service and a			
3			
*			
7			
į.			
1			
18			
-3			
4			
3			
Second Second			
ì			
4			
and the second			
4			
*			
系			

# (19)日本国特許庁 (JP)

# (12) 公表特許公報(A)

(11)特許出願公表書号

特表平7-504561

# 第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)5月25日

(51) Int,Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I			
C 1 2 N 15/09	ZNA					
1/21		8828 — 4 B				
9/20		8827 – 4 B				
		9281 - 4 B	C 1 2 N	15/ 00	ZNA A	
			(C12N	15/ 00	ZNA A	
		審查請求	未請求 予備者	<b>等查請求</b> 有	(全 24 頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特駁平5-510426		(71)出順人	ノボ ノルラ	ディスク アクテ	・ィーゼルスカ
(86) (22)出顧日	平成4年(1992)12	月18日		<b>ブ</b>		
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)6,	月20日		デンマーク国	g, デーコー―28	880 パグスパ
(86) 国際出願番号	PCT/DK92,	/00391		エルト、ノオ	マン (番地	はなし)
(87) 国際公開番号	WO93/132	0 0	(72)発明者	ヨルゲンセン	v. ステーン ト	・レールス
(87) 国際公開日	平成5年(1993)7	<b>月8日</b>		デンマーク国	I. デーコー3-	450 アレレー
(31)優先権主張番号	PCT/DK91,	/00402		ズ、ブルヌス	スパイ 5	
(32)優先日	1991年12月20日		(72)発明者	ディデリフセ	zン, ポエルゲ	クラグ
(33)優先権主張国	デンマーク (DK)		1		<b>1</b> , デーコー−34	
(81)指定国	EP(AT, BE,	CH, DE,		ーズ、フグレ	・サンスパイ 4	ı
DK, ES, FR.	GB, GR, IE,	IT, LU, M	(74)代理人	弁理士 石田	敬 (外3名	i)
C, NL, PT, S	E), BR, CA, F	I, JP, K	İ			
R, US						
•						最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リパーゼの製造のための方法

# (57)【要約】

インビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法 であって、不活性又は部分的に活性なリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせ、次いでこの混合物を変性、 それに続いて再生に付して活性リパーゼ酵素を生成せし めることを含んで成る方法。

# 請求の範囲

- 1. インピトロで活性リパーゼを製造するための方法であって
- (a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列で形質転換された 宿主編集を、そのリパーゼが不活性又は部分的に簡性な状態で生産 されるのに通する条件のもとで培養し、その培養物からこのリパー ゼ酵素を回収し、次いでその質収されたリパーゼ酵素を変性に付す 3.
- (b) 工程(a) で得られたこの変性したリパーゼ酵素をシャベ ロン分子と選ぜ合わせる、そして
  - (c) 工程(b) の混合物を其生に付して、牺牲リパーゼ酵素を 年齢すること。

を含んで成る方法。

- 2. インピトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法であって.
- (a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列で形質転換された 宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不活性又は部分的に指性な状態で 生産されるのに進する条件のもとで培養し、次いでそのリパーゼ酵 者をこの培養動から回収する、
- (b)この間収されたリパーゼ酵素をシャベロン分子と選ぜ合わせる、そして
- (c) 工程 (b) の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

3. 前記シャペロン分子が、このシャペロン分子をエンコードするDNA 配列で形質転換された宿主細胞を、このシャペロン分子が生産されるのに通する条件のもとで培養し、次いでこの培養物からそ

- のシャペロン分子を面収することによって生成されたものである、 対求項1又は2に記載の方法。
- 4. 前記シャペロン分子が、工程(b)において変性リパーゼに加えられる前に変性処理に付されている、請求項1-3のいづれか 1項に記載の方法。
- 5. インピトロで新性リパーゼ酵素を製造するための方法であっ で
- (a)リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列及びシャペロン分子をエンコードするDNA 配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでリパーゼ酵素シャペロン分子混合物をこの培養物から回収する。
- (b) 任意的にこの組合物への更なる量のシャペロン分子の抵加 を伴って、工程 (a) の温合物を変性、それに続く再生に付し、活 性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

- 6. 前記リバーゼ酵素がシェードモナス種又はクロモバクター種 に由来するものである、請求項1~5のいづれか1項に記載の方法。
- 7. 前記リバーゼ酵素が、シュードモナス セバシア、シュード
  モナス フラギ、シュードモナス グラジオリ、シュードモナス
  フルオレセンス、シュードモナス スタッツェリ、シュードモナス
  アルカリゲンス、シュードモナス シュードアルカリゲンス、シュードモナス
  アエルギノザもしくはクロモバクター ビスコスムのリバーゼ、又は前記のリバーゼ酵素の誘導体である、額求項6に記載の方法。
- 8. リバーゼ酵素の生産のためのに前記の宿主細胞が大腸室である、請求項1~7のいづれか1項に記載の方法。
- 9. 前記のリパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列に、<u>パチルススティリサーモフィルス</u> マルトジェニックアミラーゼ遺伝子、<u>パチルス リシェニホルミス</u> αーアミラーゼ遺伝子、<u>パチルス フミロリケファシエンス</u> αーアミラーゼ遺伝子、<u>パチルス スプチリス</u> アルカリンプロテアーゼ遺伝子もしくは<u>パチルス ブミルスキシロシゲーゼ遺伝子のプロモーター</u>が、又はファージラムダPaもしくはPt。プロモーター、ファージ17遺伝子10プロモーター、又は大場面1ac プロモーターが先行している、請求項8 に記載の方法。
- 10. 前記リバーゼ酵素をエンコードするDNA 配列に、<u>バチルス</u>
  スチアロサーモフィルス マルトジェニック遺伝子、<u>バチルス リシェニホルミス</u> αーアミラーゼ遺伝子、<u>バチルス アミロリケファシェス</u> αーアミラーゼ遺伝子、<u>バチルス スブチリス</u> アルカリン プロテアーゼ違伝子、<u>バチルス アミルス</u> キシロンダーゼ 遺伝子、ファージ『7遺伝子又は大幅画『ac 遺伝子のリボソーム結合 郵位が先行している、請求項8に記載の方法。
- 11. 前記リバーゼ酵素が細胞内で高収率で生産される、請求項1-10のいづれか1項に記載の方法。
- 12. 前記リパーゼ酵素が封入体の形態で生産される、請求項11に 起酬の方法。
- 13. 前記シャペロン分子が<u>シュードモナス</u> りパーゼ調節因子又はその誘導体である、請求項1-5のいづれか1項に記載の方法。
- 14. 前紀シャペロン分子が、シュードモナス <u>なパシア</u> リパーゼ調節因子、シュードモナス <u>グルメ</u> リパーゼ調節因子、シュードモナス <u>アエルギノーザ</u> リパーゼ調節因子又はそれらの誘導体より成る群から選ばれる、構水項13に記載の方法。
- 15. 前紀シャペロン分子の生産のための宿主細胞が大脇窗である、 緯水項3に紀戦の方法。

- 18. 前記のシャペロン分子をエンコードするDNA 配列に、<u>パチル</u>
  ス <u>ステアロサーモフィルス</u> マルトジェニックアミラーゼ遺伝子、
  パチルス <u>リシェニホルミス</u> αーアミラーゼ遺伝子、<u>パチルス</u>
  フミロリケファシエンス αーアミラーゼ遺伝子、<u>パチルス スプ</u>
  チリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子もしくは<u>パチルス ブミル</u>
  ス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダ
  Pa もしくは P. プロモーター、ファージ17遺伝子10プロモーター、
  又は大幅調1ac プロモーターが先行している、請求項15に記載の方
  法。
- 17. 前記シャペロン分子をエンコードするDNA 配列に、<u>バチルス</u>
  ステアロサーモフィルス マルトジェニック選伝子、<u>バチルス リシェニホルミス</u> αーアミラーゼ選伝子、<u>バチルス アミロリケファシエス</u> αーアミラーゼ選伝子、<u>バチルス スプチリス</u> アルカリン プロテアーゼ違伝子、<u>バチルス ブミルス</u> キシロシダーゼ 遺伝子、ファージ17遺伝子又は大腸菌1ac 遺伝子のリボソーム結合都位が先行している、前求項15に記載の方法。
- 18. 前記シャペロン分子が報題内で高収率で生産される、排水項13-17のいづれか1項に記載の方法。
- 19. 前記リバーゼ酵素が<u>シュードモナス セベシア</u> リバーゼであり、そして一方、前記シャペロン分子が<u>シュードモナス セバシア</u> リバーゼ調節因子である、請求項1-18のいづれか1項に記載の方法。
- 20. DNA 構築体であって、シャペロン分子をエンコードする第二 DNA 配列にリパーゼ酵素をエンコードする第一DNA 配列が、そのリ パーゼ酵素及びシャペロン分子又はその機能的な一部がこのDNA 様 築体で形質転換された適当な宿主細胞を培養することで単一の融合 タンパク質として発現されるように融合してその第一DNA 配列を含

んで成るBNA 裸築体。

- 21. 前記リバーゼ酵素をエンコードする第一DMA 配列が<u>シュード モナス</u>種又は<u>クロモバクター</u>種に由来するものである、請求項20に 記載のDMA 機能体。
- 22. 前記第一DNA 配列が、シュードモナス セパシア、シュードモナス フラギ、シュードモナス グラジオリ、シュードモナス フルオレセンス、シュードモナス スタッツェリ、シュードモナス アルカリゲンス、シュードモナス シェードアルカリゲンス、シュードモナス アエルギノザもしくはクロモバクター ビスコスムのリパーゼ、又は前記のリパーゼ酵素の携導体をコードするものである、糖求項21に記載のDNA 機能体。
- 23. 前記第二CRA 配列が、シェードモナス リパーゼ調節因子又はその誘導体をエンコードするものである、結求項20に記載のDRA 機能体。
- 24. 前記第二DNA 配列が、
   シュードモナス セパシア リパーゼ 調節因子、
   リパーゼ 調節因子、

   シェードモナス グルメ リパーゼ 調節因子、
   シェード セカン 調節因子又はそれらの誘導体をエンコードするものである、
   サスページ 調節因子又はそれらの誘導体をエンコードするものである。
- 25. 前記第一DNA 配列が、シュードモナス <u>セパシア</u> リパーゼ 又はその誘導体をエンコードし、そして他方、前記第二DNA 配列が シュードモナス <u>セパシア</u> リパーゼ調節因子又はその誘導体をエ ンコードする、請求項20~24のいづれか 1 項に記載のDNA 機能体。
- 26. 本明報書に設付のSBG 18 NO.7 に示す配列を有する請求項25に記載のDNA 権務体。
- 27. 請求項20~26のいづれか1項に記載のDNA 構築体を含んで成る組績発現ベクター。

# 生成すること、

を含んで成る方法。

- 34. リパーゼ酵素の変性及び再生処理のための方法であって、
- a) 変性及び再生処理に付するべきリパーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして
- b) 工程 a) の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リ パーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

- 28. 請求項20-26のいづれか1項に記載のDNA 構築体又は請求項 27に記載の組換発現ベクターで形質転換された宿主編数。
  - 29. 大陽南の株の細胞である、請求項28に記載の密主細胞。
- 30. 前記のDNA 権無体に、<u>バチルス スチアロサーモフィルス</u>マルトジェニックアミラーゼ遺伝子、<u>バチルス リシェニホルミス</u>αーアミラーゼ遺伝子、<u>バチルス アミロリケファシエンス</u> αーアミラーゼ遺伝子、<u>バチルス スプチリス</u> アルカリンプロチアーゼ遺伝子もしくは<u>バチルス アミルス</u> キシロンダーゼ遺伝子のアロモーターが、又はファージラムダP a もしくはP。プロモーター、ファージ17遺伝子10プロモーター、又は大腸面1ac アロモーターが 先行している、請求項25に記載の宿主網覧。
- 31. 前記DNA 構築体に、バチルス ステアロサーモフィルス マルトジェニック遺伝子、バチルス リシェニホルミス αーフミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエス αーフミラーゼ遺伝子、バチルス スプチリス アルカリンプロテアーゼ遺伝子、バチルス ブミルス キシロンダーゼ遺伝子、ファージ17遺伝子又は大場雷1ac 遺伝子のリボソーム結合部位が先行している、鏡求項29に記載の宿主細胞。
- 32. 看性状態におけるリバーゼを製造するための方法であって、 リバーゼを生産するのに選する条件のもとで請求項28~31のいづれ か1項に記載の宿主報路を培養し、そしてこの培養物からリバーゼ を回収することを含んで成る方法。
- 33. リパーゼ酵素を変性及び再生する方法であって、
- (a)リパーゼ酵素を変性処理に付する、
- (b) 工程 (a) において得られた変性リパーゼ酵素を、任意的に変性処理に付しておいたシャペロン分子と復ぜ合わせる。そして
  - (c)工程(b)の混合物を算生に付して、活性リパーゼ酵素を

# 明 福 書

リバーゼの製造のための方法

## 発明の分野

本発明は、インビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための方法、 リパーゼをエンコードするDNA 構築体、このDNA 構築体を含む組織 ベクター、及びこのベクターで形質転換された複主細胞に関する。

# 発明の背景

リパーゼは、トリグリセリドの中のエステル結の加水分解を触線して、ジグリセリド、モノグリセリド、グリセリン及び遊離脂肪酸の形成をもたらしめる酵素である。一部のリパーゼはエステル結合にかかわっているその他の反応、例えばエステル結合の合成又はエステル交換反応も触媒する。リパーゼは幅広く様々な生物により生産される。特に微生物リパーゼは、食品産業及び洗剤の如きの脂肪のリポ分解が所望されている様々な目的にとって実用的にかなり有用アネエ

布帛からの腹筋のしみ又は汚れの除去のための洗剤の中に含まれるのに特に好都合であると見い出されているある特定のリバーゼは、シェードモナス セパシア (Pasudomasas capacis)の株により生産されるリバーゼである。BP214761号において (Novo Industri A/S)、このリバーゼは50で以下の温度で牺牲であるリバーゼとして開示されており、これは重要であり、なぜなら最近は布帛は60で以下の温度で洗浄されているからである。

統制級加利として利用するのに別の重要なシュードモナス セパシア リパーゼは、W089/01032 (Novo Industri A/S)において郵位

非特異性リパーゼとして関示されているもの、即ち、トリグリセリ ドの3個の脂肪アシル基全でと反応できるものである。

<u>シェードモナス</u> <u>セパシア</u> リパーゼ生産を助長するために、猛 接DNA 技術を、例えば酵素をエンコードするDNA 配列を発現せしめ る強力なプロモーターを導入することにより、又はより効率的なリ ボソーム結合部位もしくはシグナルペプチドコード配列を導入する ことによりリパーゼ発現を最適化するために、あるいは酵素の生産 のための、培養し易い(例えば標準の生産性生物、例えば大腸菌を 遊ぶこと)又は高めのリパーゼ収率をもたらしめる信主生物を選ぶ ために、採用することが好都合でありうる。

しかしながら、以下に説明する進り、かかる手柱は時折り予測の結果を得ることに失敗することが、例えば課題のタンパク質をコードする構造遺伝子の他に1又は複数の遺伝子がその遺伝子生成物の生産にある観度の役割を担っているときのケースにおいてありうる(かかる遺伝子の例は、パチルス(Bacillys)のsac 及びlep 遺伝子、並びにクレブシーラ(Kishsisils) プルラナーギ及び大腸室へモリシンの生産にとって必要な遺伝子である)。

別のシェードモナスの種、シェードモナス フラギ(Passiononas fragi)からのリパーゼ選伝子のクローニングは、例えばS. Acyana ら (1988) 及びM. Nuginiya ら (1986) より公知となっている。しかしながら、P. フラギより生産されるリパーゼは、P. セパシアより生産されるそれとはそのアミノ酸配列において構選しており、そしてこれらの文献において、宿主生物の中で有意な量のリパーゼの生産を達しめるのに1又は複数の更なる遺伝子が必要でありうることの示唆はない。

EP331376号は、<u>シュードモナス</u> <u>セパシア</u> リパーゼをエンコードする組織DNA 及びこのリパーゼの生産にかかわるタンパク賞を開

示する。

M090/00908号は、宿主報館の中で発現されるポリペプチドによる 異種宿主報館における<u>シュードモナス セパシア</u> リパーゼの生産 を顕示しており、そのポリペプチドはリパーゼ生産の調節因子として**巻**いている。

#### 発明の概要

薫くべきことに、組集権主報能により生産される活性リパーゼ酵素の収率は、その細胞から回収されたリパーゼを変性、それに減くシャペロン(chaperone)分子の存在下での再生に付したときに高めることが可能であることが見い出された。

使って、本発明はインビトロで牺牲リバーゼ酵素を製造するため の方法に関連し、この方法は

- (a)リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列で形質転換された 宿主補助を、そのリパーゼが不悟性又は部分的に牺牲な状態で生産 されるのに返する条件のもとで培養し、その培養物からこのリパー ゼ酵素を回収し、次いでその回収されたリパーゼ酵素を変性に付す る、
- (b)この変性したリパーゼ酵素をシャペロン分子と選ぜ合わせる。そして
- (c) 工程(b) の混合物を再生に付して、活性リパーゼ酵素を 生成すること、

を含んで収る。

他方、本発明はインビトロで牺牲リパーゼ酵素を製造するための 方法に関連し、この方法は

(a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列で形質転換された 宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不悟性又は部分的に悟性な状態で

生産されるのに選する条件のもとで培養し、次いでそのリパーゼ 素をこの培養物から区収する、

- (b)この面収されたりパーゼ酵素をシャペロン分子と選ぜ合わせる、そして
- (c) 工程(b) の複合物を変性、それに続く再生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

更なる態様において、本発明はインピトロで活性リパーを酵素を 製造するための方法に関連し、この方法は

- (a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA 配列及びシャペロン分子をエンコードするDNA 配列で形質転換された宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不断性又は部分的に液性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでリバーゼ酵素シャペロン分子混合物をこの培養物から間収する、
- (b)任意的にこの混合物への更なる量のシャペロン分子の抵加を停って、工程(a)の混合物を変性、それに続く算生に付し、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

上述した適り、本発明は、タンパク質又はタンパク質複合体の天然のコンホメーションが常にそのタンパク質のアミノ酸配列によってのみ決定されるわけではないことの発見に基づいている。従って、あるケースにおいては、シャペロン分子と呼ばれているアクセサリータンパク質が別のタンパク質又はタンパク質複合体の適正なる三次構造の形成を仲介するのに必要であるが、それら自体は最終機能構造体の成分ではない(811is ら、1891)。

本明報書において、「シャペロン分子」なる語は、かかるアクセ サリータンパク質、即ち、他のポリペプチドのそのほどかれた状態 の保持を助長することに、その適正なトランスメンプラン機的化又は折りたたみ及びオリゴマー集成を可能とすることに、並びにタンパク質複合体の解離にかかわるタンパク質を意味することを意図している(R. J. Billa とS. H. Benningson (1989)。J. S. Rothman (1989)。Morimotoら(1990)を参照のこと)。一般に、標的タンパク質又はタンパク質複合体の共有修飾はシャペロン分子の作用によっては観察されていないが、本発明の方法において用いるシャペロン分子がかかる共有修飾を及ばしめることが可能であることを解除することはできない。従って、本明細書で用いている「シャペロン分子」なる際は、リパーゼ酵素の非共有及び共有修飾を及ばしめるシャペロン分子を包括することを意図している。

別の観点において、本発明は、リパーゼ酵素をエンコードする第一DNA 配列を含んで成るDNA 精験体に関連し、この第一DNA 配列は、シャペロン分子をエンコードする第二DNA 配列に、このリパーゼ酵素及びシャペロン分子又はそれらの機能性部分が、そのDNA 補験体で形質伝統された過当な宿主報路の培養に基づき、単一の融合タンパク質として発現されるような状況で融合されている。

# 発明の詳細な開示

前述の工程 b)における図収及び任意的に変性されたリバーゼ酵素に添加すべきシャペロン分子は、シャペロン分子をエンコードするDNA 配列で形質転換された有主細胞をそのシャペロン分子を生成するのに適する条件のもとで培養し、次いでそのシャペロン分子をその培養物から図収することを含んで成る方法によって生成されることが好都合である。更に、変性リバーゼ酵素にシャペロン分子を添加するとき、そのシャペロン分子首体が変性していることが好都合でありうる。従って、本発明の方法は、シャペロン分子を工程 b)

における変性リパーゼ酵素と選ぜ合わせる前に、それを変性処理に付する更なる工程を含んで成りうる。

本男領書において、リパーゼ脚業について用いている「都分的に 話性な状態」とは、リパーゼが、例えば後述するIRスタットを利用 する力価検定による話性測定による決定に従い、完全ではないがある 程度の話性を有することを意味していることを意図している。完 全より劣る活性とは、その部分的に活性なリパーゼ調製品が、完全 活性リパーゼタンパク質の対応の調製品に比して低い比較性を有す る意味としてとられる(この二つの調製品は、総量が同じリパーゼ タンパク質を含む)。

不悟性又は部分的に活性なりパーゼ酵素及び任意的なシャペロン分子の変性(これは、本発明の方法に従い、別々に、又はこの2種の成分の混合物に基づいて実施されうる)は公知の方法で実施されうる。例えば、その変性は、その混合物を変性期(例えば8Mの尿素)の作用に付し、次いでその変射を例えば透析により除去することによって復得されうる。

本発明の方法による製造にとって好通なリバーゼは、シュードモナス種又はクロモバクター(Chromobacter)種に由来する。特に、このリバーゼ解素は、シュードモナス セパシア、シュードモナス フラギ、シュードモナス グラジオリ(Pseudomonas gladioli)、シュードモナス アルオレセンス(Pseudomonas fluorescens)、シュードモナス フルオレセンス(Pseudomonas atutseri)、シュードモナス アルカリゲンス(Pseudomonas alcaligenes)、シュードモナス フェードアルカリゲンス(Pseudomonas pseudomolas insenses)、シュードモナス ブナグ(Pseudomonas putide)、シュードモナス グルメ(Pseudomonas glusas)、シュードモナス グルメ(Pseudomonas glusas)、もしくはク

ilcheniformis)、パチルス レンスタス (Bacillus jentus)、パチ ルス プレビス (Bacillus brevis)、バチルス ステアロサーモフ イルス (Bacilius Stearothermophilus)、パチルス アルカロフィ ルス (Bacillus alkalophilus)、バチルス アミロリケファシエン ス (Bacillus amyioliquefacions) 、パチルス コアギュランス (Bacillus coagulans)、バチルス サーキュランス (Bacillus circulant)、バチルス ラウタス (Bacillus lautus)又はスレプト <u>マイセス リビダンス (Streptomyces lividans)</u>でありうる。大腸 裏は高収率の、即ち蛇細胞タンパク質の少なくとも5%の(細胞内) リパーゼを生産することができ、従って好遺な街主生物である。大 語雷において、リパーゼ酵素は封入体(inclusion bodies)の状態 で生産されるのが典型的である。福薗の形質転換は例えばプロトブ ラストの形態転換により、又はコンピテント細胞の利用により、公 知の方法で行われうる。その他の道当な細菌宿主和靴は、<u>シェード</u> モナス種の報酬、例えばシェードモナス セパシア、シェードモナ ス フラギ、シュードモナス グラジオリ、シュードモナス フル オレセンス、シュードモナス スタッツェリ、シュードモナス ア <u>ルカリゲンス、シュードモナス</u> <u>シュードアルカリゲンス、シュー</u> ドモナス ブチダ、シュードモナス グルメ又はシュードモナス アエルギノザの解散である。

他方、密主編的は雷頻、即ち酵母又は糸状密類の細胞でありうる。この酵母宿主細胞は例えば<u>サッカロマイシス(Saccharomyces)</u>裏の細胞、例えば<u>S. セレビジエ(S. cerevisiae)</u>でありうる。糸状密類の宿主生物は好適には延換タンパク質を生産するのに従来から宿主として利用されてきたもの、例えば<u>アスペルギルス(Aspergillus)</u>種の株、例えば<u>A. ニがサー(A. niger)、 A. ニドウランス(A. nidulans</u>)又は<u>A. エリザ(A. orysse)</u>でありうる。密類の宿主組

ロモバクター ビスコスム (Chrmobacter Viscosum) リパーゼ、又は前記リパーゼ酵素の誘導体でありうる。特に、リパーゼ酵素はシュードモナス セパシアの株、例えばEP214761号に調示の発明に関係してドイチェ サムルンク フォン ミクロオルカニズメンに客託されている書託者号DSH 3333-3337 及びDSH 3401の株、並びに、W089/01302に開示されている発明に関連してドイチェ サムルンクファン ミクロオルカニズメンに客託されている音託者号DSH 3959の株に由来するものである。

本別報書において、「競導体」なる器は、天然のリバーゼから、天然リバーゼをコードするDHA 配列を速文をせいた、その大統リバーゼをコードするDHA 配列を速文をでは、1 又は、1 文をであること、では、1 文をである。 1 文をである。 2 文をである。 3 文をでは、 3 文をでは、 5 文をできない。 5 文をできないい。 5 文をできないい。 5 文をできない。 5 文をできない。 5 文をできない。 5 文をできないい。 5 文をできないい。 5 文をできないい。 5

本発明の方法において用いられる復主細胞はあらゆる適当な細胞であって、培養により大量のリパーゼを生産するものでありうる。 適当な細菌の例にはグラム陽性細菌、例えば<u>パチルス スプチリス</u> (<u>Bacillus subitila)、パチルス リシュニホルミス</u>(<u>Bacillus</u>

数を形質転換するのに及び紙換タンパク質の発現を遺得するのに利用されている技術はEP238023号に配載されているものが適当でありうる。

宿主細胞の中でのタンパク質の発現にとって、このタンパク質をエンコードするDNA 配列にプロモーターが発行していてよい。このプロモーターは選ばれた宿主の中で強力な転事話性を示すあらゆるDNA 配列であってよく、そして細胞外又は細胞内タンパク質、例えばアミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロチアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ又は解糖酵素をエンコードする遺伝子に由来しうる。

タンパク質の発現にかかわるその他の配列には、終止及びポリア デニル化配列、並びにリポソーム結合部位が含まれ、そしてプロモ ーターと同じ起源に由来するのが退当でありうる。

本発明の方法において、リバーゼ脚素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA 配列には、バチルス スチアロサーモフィルス マルトジェニック アミラーゼ違伝子、バチルス リシェニホルミス αーアミラーゼ違伝子、バチルス フミロリケファシエンス αーアミラーゼ違伝子、バチルス スプチリス アルカリンプロテアーゼ違伝子、もしくはバチルス ブミルス キシロシダーゼ 遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダP。もしくは大路面1acプロモーターが先行しているのが好都合である。リバーゼ脚素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA 配列には、バチルスステアロサーモフィルス マルトジェニック アミラーゼ違伝子、バチルスフェリンエニホルミス αーアミラーゼ違伝子、バチルスフェリケファシエンス αーアミラーゼ違伝子、バチルスフェルカリンプロテアーゼ違伝子、バチルスフェルカリンプロテアーゼ違伝子、バチルスフェルス アミロリケファシエンス ローアミラーゼ違伝子、アルススプラリス アルカリンプロテアーゼ違伝子、バチルス フェルス キシロシダーゼ違伝子、ファージ17遺伝子10又は大器面1ac 遺伝子の

リポソーム複合部位が先行していてよい。

本発明に従うと、シャベロン分子は<u>シュードモナス</u> リバーゼ調節タンパク質、好ましくは<u>シュードモナス セパシア</u> リバーゼ調節因子(wogo/00g08号に関示)、<u>シュードモナス グルメ</u> リバーゼ調節因子及び<u>シュードモナス アエルギノーザ</u> リバーゼ調節因子より減る癖から選ばれるもの、又は任意のかかるリバーゼ調節因子の誤事体であることが好都合である。

本明細書において、リバーゼ調節因子の誘導体は、リバーゼ酵素の誘導体に関して上記したのと同じ状況である、即ち、前配の通りに、天然リバーゼ調節因子についてコードするDNA 配列を通宝改変することにより天然リパーゼから誘導されたシャベロン括性を有するタンパク質であると理解される。この誘導体のシャベロン活性は、例えば本明細書に記載の通り、活性リバーゼ酵素の生産におけるその誘導体の能力の分析により決定されうる。

本発明にかかる方法の好選な整様において、リバーゼ酵素は<u>シュードモナス セパシア</u> リバーゼ又はその誘導体であり、そしてシャペロン分子は<u>シュードモナス セパシア</u> リバーゼ関節因子(又はその誘導体)でありうる(共に、MOSO/00908号に開示)。

リパーゼ脚業及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA 配列を含んで成る本発明のDNA 標集体はゲノム又はcDNA分割であってよく、例えば過当な生物のゲノム又はcDNAライブラリーを用意し、そしてリパーゼ又はシャペロンの全体又は一部をコードするDNA 配列を、概率の技術に従う(Sambrookら、1989を参照のこと)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによりスクリーニングすることによって得られるものである。

本発明のDNA 機能体は確立されている標準的な方法、例えばS. L. Beaucageら(1981)、Natthes ら(1984)により述べられているホ スポアミジット法により合成的に製造することもできうる。ホスポアミジット法に使うと、オリゴヌクレオチドを例えば自動DNA 合成装置で合成し、特製、リゲートそして適宜のベクターの中にクローンする。

最後に、このDNA 構築体は合成とゲノムとの複合物、合成とcDNA との複合物、又はゲノムとcDNAとの複合物であって、合成、ゲノム 又はcDNA組織のフラダメント(適宜)を、この会DNA 構築体の様々 な部分に対応するフラグメントに、標準の技術に従ってリゲートす ることによって製造したものでありうる。

本発明のDNA 構築体において、リパーゼ構築体をエンコードする DNA 配列は<u>シュードモナス</u>種又は<u>クロモバクター</u>種に出来するもの であってよい。例えば、前配第一DNA 配列は、<u>シュードモナス</u> 生 パシア、シュードモナス フラギ、シュードモナス グラジオリ、 シュードモナス フルオレセンス、シュードモナス スタッツェリ、 シェードモナス アルカリゲンス、シェードモナス シェードアル カリゲンス、シュードモナス アチダ、シュードモナス グルメ、 <u>シュードモナス アエルギノーザ</u>もしくは<u>クロモバクター ビスコ</u> スム リパーゼ、又は上記のリパーゼ酵素の携導体をエンコードす るものでありうる。前記第二DNA 配列は、<u>シュードモナス セパシ</u> アーリパーゼ病節因子、シュードモナス グルメ リパーゼ調節因 子、シュードモナス アエルギノーザ リパーゼ調節因子、もしく はその他の<u>シュードモナス</u> リパーゼ調節因子タンパク賞、又は任 意のこれらの調節因子の禁導体をエンコードするものでありうる。 最も好ましくは、この第一BNA 配列は<u>シュードモナス セパシア</u> リパーゼ又はその誘導体をエンコードし、そして第二DNA 配列は引 用することで本明報書に組入れるNO90/00908号に記載の<u>シェードモ</u> ナス セパシア リパーゼ調節因子又はそれらの誘導体をエンコー

FT &.

特に好遇なDNA 機能体は本明報書に抵付したSBQ 1D No.5 に示す配列を有するものである。この配列は常用の方法に従って改変されていてよい。このDNA 配列の適当な改変の例は、ヌクレオチド置換であって、リパーゼ又はリパーゼ調節因子のアミノ酸配列を別のものにはしないが、そのDNA 標準体を導入する宿主生物のコドン用法に対応しうる置換、又はヌクレオチド置換であって、リパーゼもしくはリパーゼ調節因子のいづれもの性質を振うことなく、別のアミノ酸配列による、それ故、可能としては、別のポリペプチド構造にする置換である。その他の可能な改変の例は、配列への1又は複数のヌクレオチドの付加、及び配列の末端又は配列内のいづれかでの1又は複数のヌクレオチドの付加、及び配列の末端又は配列内のいづれかでの1又は複数のヌクレオチドの欠失である。

要なる観点において、本発明は前記のDNA 標案件を含んで求る組織発現ベクターに関連する。リバーゼ及び/又はシャベロン分子をエンコードするDNA 配列を保育する発現ベクターは、一定の宿主生物の中での自己複製可能な任意のベクター、臭型的には、ブラスミド又はバクテリオファージでありうる。ベクターにおいて、リパーゼ及び/又はシャベロン分子をエンコードするDNA 配列では過当なプロモーター配列に作動連結しているべきである。このプロモーターは借生細胞の中で転写活性を示す任意のDNA 配列であってよく、そして宿主生物に対して同種又は異種のいづれものタンパク質をエンコードする遺伝子に由来しうる。このプロモーターは好ましくはバチルス ステアロサーモフィルス マルトジェニック アミラーゼ遺伝子、バチルス リシェニホルミス αーアミラーゼ遺伝子、バチルスフェンス アルカリン プロテアーゼ遺伝子、ビチルスフェンカ アルカリン プロテアーゼ遺伝子もしくはバチルス

<u>プミルス</u> キシロシダーゼ遺伝子のプロモーター、又はファージラムダP』もしくはP。プロモーター、ファージ17遺伝子10プロモーター、又は大腸歯lac プロモーターである。

このベクターは選択マーカー、例えば遺伝子であってその生成物が抗生物質耐性、例えばアンピシリン、クロラムフェニコールもしくはテトラサイクリン耐性を授けるもの、又は<u>日。スプチリス</u>もしくは<u>日、リシェニホルミス</u>由来の<u>4x1</u>遺伝子も含んで成りうる。

更なる別の観点において、本発明は牺牲状態におけるリバーゼの 製造方法に関連し、この方法は、上記のBNA 構能体で形質転換され た宿主細胞をこのリパーゼを生皇するのに達する条件のもとで培養 し、次いでこの培養物からリバーゼを固収し、任意的にこのリバー ゼ/シャペロン融合タンパク質の変性及び再生が後に続くことを含 んで成る。

細胞の培養に用いられる培地は細菌の増殖にとって適当な任意の常用の培地でありうる。リパーゼはこの培地から、常用の手順、例えば、必要ならば細胞内生成物を関収するための細胞の破壊の技の遠心もしくは減適により、塩、例えば硫酸アンモニウムによる上清液もしくは減液のタンパク質性成分の沈酸、それに続く様々なクロマトグラフィー手順、例えばイオン変換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等による複製により、分離せしめることによって買収されうる。

酒性リパーゼ酵素の調製におけるシャペロン分子の利用は組織 DNA技術に関連して特に重要であるが(前配に載明した通り)、シャペロン分子の存在は、リパーゼ酵素の製造方法にかかわらず、本明報書記載の活性リパーゼ酵素が所望する任意の変性及び再生処理に関連して重要である。従って、例えば変性処理に付すべき天然又は遺伝子操作にかけられていない生物の常用の発酵により生産され

ーンは:

C

D

E

F

G

1

.1

K

Ł

N

Q

H. M&R

A&S

従って、更なる一般的な観点において、本発明はリバーゼ酵素を 変性及び再生する方法に関連し、この方法は

- a)リパーゼ酵素を変性処理に付する、
- b) 工程 a) において得られた変性リパーゼ酵素を、任意的に変性処理に付しておいたシャペロン分子と選ぜ合わせる、そして
- c)工程b)の混合物を算生に付して、活性リパーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

従って、リバーゼ酵素の変性/再生処理は

- a) 変性及び専生処理に付するべきリパーゼ酵素をシャペロン分子と選ぜ合わせる、そして
- b) 工程 a) の混合物を変性、それに統く再生に付して、括性リ パーゼ酵素を生成すること、

により実施されうる。

#### 四面の影明

本発明を、抵付の図面を参考にしながら下記で説明する。ここで

図 1 はプラスミドpANE2 を示し:

図2はプラスミドpANNS を示し;

図3はプラスミドpARE10を示し;

図4はプラスミドpC886 を示し;

図5はプラスミドpC887 老示し;

図 6 はプラスミドpC8#12を示し;

図7はプラスミドpCBB18を示し:

図 B はプラスミドpCBE19を示し;

(b) において (Lie イムノブロット) 、レーンは以下を含んでいた:

せたタンパク質のSDS -PAGE分析の結果を示し、ここでそれらのレ

30 C

42 T

42 °C

42 T

P. セパシア由来の精製リパーゼ

42 T

42 °C

42 T

- I PTG

+IPTS

+ I PTG

+ I PTG

図10はLip 抗体を利用した例 3 紀戦の通りに実施したイムノブロ

pJN2 (ベクター)

pAHB10 30°C

PARE2

PASE2

p###2

PAHE10

PAREIO

PAKE2

pC886

PCBES

pCBE6

pCBE6

ット分析の結果を示し、ここでレーンは:

PARE2

分子量マーカー: 45. 36. 24及び20

pSJ15D (pNC 中のオリジナルのリパーゼ構築体)

1. 0 時間 (hr)

1. 0 hee

1. 5 brs

2.0 bra

l. O hra

1. 0 hrs

I. 5 bra

20 hrs

1. 0 hrs

I. O bra

1. 5 hrs

20 hrs

A pJ\$8より発現された]im

B 細胞内面分

C ベリプラズマ買分

D 細胞外面分;

図12はプラスミド pAH819を示し; 図13はプラスミド pAH822を示し;

図14はプラスミドpAHB16を示し;

図15はプラスミドpASE23を示し;そして

図16はプラスミドpCBF1-6 を示す。

本発明を下記の実施例で更に説明するが、これらは本発明の諸求 の範囲を確定することは意図しない。

方法および材料

大陸官 TG1 supE had-5 thi-(lac-proAB) P'[traD36proAB+lac]q lacZ-M(5)(Gibson, 1984)

大陽車 JA221 (Clarke and Carbon, 1978)

太陽童 BL21 (BE3) B株リソゲン, placUV5-17 RNApol (IPIG 株発性) (Studier, 1990)

ブラスミド

pSJ150-Jorganson et al. (1991)

pJW2-Wang et ml. (1990)

p273a-Rosenberg et al. (1987)

pT7-7-Star Tabor, Dept. of Biol. Chem., Harvard Medical Schoolより入手

plysB とplysS-pACYC184::ptet及び対立配向由来の17リゾチーム (Studier, 1990)。

A	pJW2(ベクタ	· <b>-</b> )	
В	pSJ150		
С	PASE2	30℃	1. 0 hr
D	pABE2	42°C	1. 0 hr
E	pAHE2	42 °C	1. 5 hre
F	PAHES	42°C	2. 0 hrs
G, L, Q, S	P. 4/27	出来の精事	望リパーゼ (10L8)
н	PANELO	30 °C	1. 0 hr
1	pAHS10	42 °C	1. 0 hr
j	pAEE10	42°C	1. 5 hrs
к	pARE1G	42 °C	2. 0 hrs
м .	pCBE6	- I P T G	1. 0 br
N	pCBE6	+ I P T G	1. 0 hr
0	pCBE6	+ [ PTG	1. 5 hrs
P	pCBE6	+IPTG	2.0 hrs
R	pABE2 + pAi	8810. 42 T	: 1. 5 hrs;

図11は、リバーゼのイムノブロット分析により決定された<u>P. セパシア</u>の中でのLieAの細胞所在(図11 a)、並びに<u>P. セパシア</u>の細胞内(細胞質及び細胞内膜)、ペリプラズマ及び細胞外面分においてオレイルアルコールで誘発されたLia (図11 b)を示す。等量のタンパク質を、0.01、17及び21%のそれぞれに対応する各レーンに添加した。 (a) において(リバーゼ イムノブロット)、レーンは以下を含んでいた:

- A <u>P. セパップ</u>由来の精製リパーゼ
- B 細胞内面分
- C ペリプラズマ面分
- D 細胞外面分;

#### 一般方法

標準DRA 操作は、本質的にSambrookら(1989)に記載の通りに実施した。

制度酵素、Ta DNAリガーゼ、DNA ポリメラーゼ [ (クレノウフラーグメント) はBookringer Hanabeis 又はProsessa より入手し、そしてその供給者の推奨の通りに用いた。

ニワトリ卵白リゾチームはSigna より入手した。

プラスミドの領製及び大議官の形質転換はSambrookら(1989)に 記載の通りに実施した。

Sambrookら(1989)に記載の通りにSDS ーポリアクリルアミドゲルを用意し、電気染動し、そして致色した。

タンパク質分子量マーカーはSigna より購入した。

# リバーゼ分析

リパーゼ活性は、グリセロールトリプチレート又はオリープ補エマルションのいづれかと、ブリリアントグリーンを含むプレート上で検出した。リパーゼ活性は基質としてグリセロールトリプチレートを用いてpBースタット法により測定した。ILU(リパーゼユニット)は、下記の条件のもとで1分割り1g solsの 演定可報な監察を避解せしめる録素の量である:

達 度

30.00

ρĦ

7.0

乳化剂

アラピアゴム、50ml/1

(Jargensen 6. 1991).

リパーゼスクリーニングアッセイはマイクロタイターディッシュ の中で下記の手順に従って実施した:

まず乳化試薬を作る:

17.9g @NaCl+0.41g @KEzPO.+ 6.0 g @ 7 > 27 7 1 + 540 ml

のグリセロールを、脱ミネラル水で1000mlの最終容量にする。

リパーゼアッセイ試楽を下記の道りに作る:

12.5mlの上記の乳化試棄+3.75mlのグリセロールトリプチレート +0.25mlのブリリアントグリーン(8.0 中で40mg/ml) +50mlの10 mHのトリスpH 9.0 をUltra Turrax乳化器の中で 1分間乳化させる。

実際のアッセイは、100 miのこのアッセイは裏を100 mlのリパーゼサンプルと混合することにより実際する。発色を、既知のリパーゼサンプルのそれと比較した。

ブリリアントグリーンプレートは15mlのLBアガーより成り、10%のオリーブ情エマルション 0.3 mlと裏智水中の40mg/mlのブリリアントグリーン特技 0.1 mlとを含む 3 mlのLBアガーのトップ層を有する。オリーブ他エマルションは、オリーブ他10ml+アラビアゴム1g+脱イオン水90mlであり、Fitra Turrax乳化器を用いて混合した。高レベル発現のための大路回治養物の誘発

#### (a) oJW2をベースとするプラスミド

一夜培養物をオービタルシューカーの中で250 rpm で30℃で増殖させ、 F:100 に秸択し、そして0.5 のA600が進せられるまで30℃で3~4 hr増殖させた。1 組のデュブリケート特養物のうちの一方をタンパク質合成の誤発のために42℃に移した。両培養物からサンプルを、誘発後0、30、60、90及び120 分において取った。

#### (b) pBT3a/pT7-7 をベースとするアラスミド

一夜培養物をオーピタルシェーカーの中で250 rpm で30℃で増殖させ、1:50に発釈し、そして0.5 の4600が進せられるまで30℃で増殖させた。1組のデュブリケート培養物のうちの一方にIPIGを1.5 mXの最終過度となるまで加えた。IPTGの添加の15mis 後に、誘発培養物にリファビシンも100 μ g / miの最終過度となるように加えてよい。両培養物から、誘発後0,30,60,90及び120 分の時間

においてサンプルを取った。

# タンパク質サンアルの処理及び調製

サンプルを直ちに 0 でに冷やした。銀胞をマイクロ遠心機で 12.000 g、5 分、4 ででの遠心により関収した。細胞ペレットをラエムリサンプルパッファーの中に再懸濁させ、そしてー20でに連結した。タンパク質をその上清液から、等容量のアセトンの影加、及び水上で30min の放置、それに続く15min 12.000 g、4 ででの遠心により沈殿させた。沈殿タンパク質をラエムリサンプルパッファーの中に再懸濁し、そしてー20でで連結した。

SBS ーポリアクリルアミドゲル電気体動によるタンパク質の分析 タンパク質サンプルを、12%のSBS ーポリアクリルアミドゲルに 載せる前に5 min 煮換した。ゲルをトリスーグリシンの中で、数色 先権がゲルの頃に到達するまで電気体動し、そして0.25%のクマジ ープリリアントブルーで数め、次いで10%の酢酸の中で頭色した。

ウェスタン分折

利用した方法はTouble ら(1979)のそれと同等である。タンパク質サンプルを12%のSDS ーポリアクリルアミドゲルにおいて電気泳動し、そしてニトロセルロースに電気泳動的に転写させた。フィルターをブロッキングパッファーとプレインキュベートし、次いで抗リパーゼ抗体とインキュベートした。次にアルカリホスファターゼコンジュゲート化、ヤギ抗ーウサギlef(Sisse)をフィルターとインキュベートした。ニトロブルーテトラゾリウムと5ープロモー4ークロローインドイルホスフェート(共にSisse 由来)を用いてタンパク質を動別化させた。

## 細胞溶解のための方法:Haratoa (1987)から採用

一夜培養物を100 m!のLB培地に 1 : 100 に得収し、次いで 0.5 の 00600 値へと増殖させた。pAHB2 及びpAHB10のケースにおける熱に よる、並びにpC886 のケースにおける[PTGによる誘発を2時間行った。その培養物を次に500 gで15分、4℃で遠心した。その上清核を除去し、そしてそのペレットを秤量した。大腸面細胞の各グラム(ウェット重量)に対して3mlの神解パッファーを加え、そしてそのペレットを腎臓機させた。搾解パッファーは50mlのトリス、C1、1mlのBDTA。100 mlのNaClを含んでいた。

# **対入体の特製及び批浄: (Maraton ら、1984)**

複数リゼートを12,000 g、15分。 4 でで遠心した。その上演複をデカントし、そしてそのペレットを、0.5 %のトリトン及び10mHのBDTAを含む 9 容量の物解パッファー(pE 8.0 )の中に再駆器させた。室道で 5 分保存後、12,000 g、15分。 4 でで遠心した。その上演核をデカントし、そして機に置き、そしてそペレットを100  $\mu$ 1 の  $H_{*}$ 0 に再駆揚させた。その上演液及び再延揚ベレットから10  $\mu$ 1 の サンプルを取り、そして10  $\mu$ 1 の21の808 ゲル装営用パッファーと 選ぜ、そして805 ーポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析して、課題のタンパク質のほとんどがペレット中にあるかを調べた。pA 8 8 2 のリパーゼスクリーニングアッセイも実施した。

封人体の可律化及び再生:(Harston ら(1984)より採用)

0.1 mHのPHSF(加えたばかり)、 8 Mの原素(肌イオン化)及び 0.1 Mのベーターメルカプトエタノールを含む100 #1の溶解パッ ファーを洗浄したペレットに加え、そして室温で1時間保存した。 リパーゼ活性スクリーエングアッセイは、タンパク質が全体的に変 性したことに基づいてリバーを活性が衝失したかどうかを調べるた めに実施した。50g1づつの変性タンパク質サンブルを適折用チュ ーブに入れた。タンパク賞サンプルを50mMのKH:PO。(pH10.7) 、 1 shのBDTA(pH 8.0)、50mHのNaCl、並びに 8 Mの原素及び 0.1 Mの BMB も合むパッファーの中で透析した。pHはKOR で10.7に保ってお いた。8Mの原素の中での最初の遺析は一夜行った。係めの濃度の 展案(即ち、 6 M ; 4 M ; 2 M ; 0 M ) を用いる更なる遠析はBME 抜きの上記のパッファーの中で行った。これらの遺析反応体のplick BCI を用いてB.Oに保っておいた。更なる濃度の原素それぞれの中 での透析は6時間行った。コントロール実験として、デュブリケー トのサンプルを上記の通りに実施したが、ただし原素とBME は無し で行った。

変性サンブルを通折チューブから取り出し、そしてこれらのサンブルのリパーゼ活性をグリセロールトリブチレート及びブリリアントグリーンブレート上で調べた。そのリパーゼ活性も、マイクロタイターリパーゼスクリーニングアッセイを用いて検査した。

SDS - ポリアクリルアミドゲルからのタンパク質の回収 SDS - ポリアクリルアミドゲルからのタンパク質の回収の手順は Reaer とBurgeag (1980)に記載してある。タンパク質サンプルを SDS - ポリアクリルアミドゲル上で電気体動させた。電気体動後、そのゲルをトレイに移し、水ですすぎ、そして水冷の250 eHのKC1 及び 1 aHのDTT で含む冷水で

脱色し、次いで対象のタンパク質パンドを切り取った。(ゲルの一部はクマジーブルーで染めて、適正なパンドを切り取ったかを確実とするために分子量標準品を染めた)。そのゲルをGI8 の針の付いた1 eIのシリンジを選じて破砕し、そして0.1 %のSDS, 50 eHのトリス IECI(pHT.9) , 0.1 eHのIDIA。5 eHのDIT 及び200 eHのNaC1を含む1 eIの溶離パッファーを加えた。タンパク質を、時折り撹拌しながら、25でで少なくとも I 時間溶離させた。その返る物を簡単に遠心して破砕ゲルをペレット化させた。そのタンパク質を上液液から、4 容量の冷アセトンを加え、次いで一70でで20min インキュペートすることにより沈酸させた。沈数タンパク質を遠心し、そしてそのペレットを執した。

# ウサギの中での抗ーLimA抗血清の作製

Linaに対する抗体を発生させるため、3 羽のウサギに精製Linaをソバク質を、Valtukaitia(1981)に述べられているのと類似のスケジュールに従って注射した。Linaをソバク質を調製SDS ーポリアクリルアミドゲルから精製した。1 日日において、10mHのリン酸ナトリウム、987、2 中のLina を完全フロインドアジュバントと選ぜ、そして各ウサギの背中に10箇所において皮内注射した。21日目に、不完全フロインドアジェバントと選ぜたブースター注射を各ウサギの足に筋肉内注射した。関一のブースターを同じようにスケジュールの31日目に注射した。試験血は抗ーLina 抗体が作製されたことを示した。

#### 培地

LB

リッター当り:10gのパクトートリプトン 5gのパクトー酵母抽出物 10gのNaCi

プレートは2%のアガーを含んだ。

# 夹指例

## **#**1

高レベルのLipA発現のための構築

# (a) 11pA+1|mA:pAHE2 &pAHEE

プラスミドphHB2 (図1)を、pSJ150 (Jorgensen ら、1991)由来のlipA+lisaの両者をエンゴードする2.264 kbのNsilフラグメントをNdelー清化pJH2 (Nengら、1990)にサブクローンすることによって標築した。リゲーション体を大脳面TGI に30℃で形質転換せしめ、次いで選正な配向においてインサートを育するプラスミドを同定するためにDXA ミニ調製品を利用した。pAHE2 は獲得したいくつかの遺正な構築体のうちの一つである。pAEE2 において、リバーゼ遺伝子の開始コドンはファージT7リボソーム結合部位のすぐ下値にある。

857 はpane2 で形質転換した大陽蜜株JA221 である。857 を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、リパーゼタンパク質がSDS ポリアクリルアミドゲル上で同定でき(ウェスタン分析により)、モレてリパーゼ活性がブリリアントグリーン及びグリセロールトリプチレートプレート上で、並びにマイクロタイターアッセイ及びpsスタット法により検出できた。

プラスミドpABE8 (図2) は、pABE2 由来のlipA+limAをエンコードする2.264 kbのNdslフラグメントを、Ndslで満化しておいた発現ベクターpET3s にサブクローンすることによって構築した。リゲーション体を大腸幽株TG1 に形質転換せしめ、そしてプラスミドのNA ネチの影響を操体から環動して適応なプラスミドを限定した。

873 はpAHE8 で形質転換された大幅窗検5L21 (DE3) pLys S である。 E73 を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、

リパーゼタンパク質 (およその#N34KD) がSDS ーポリアクリルアミドゲル上で認められ、そしてリパーゼ活性がブリリアント グリーン及びグリセロールトリプチレートプレート上で、並びにマイクロタイター アッセイで検出できた。

# (b) limAを伴わないlipA: pAEB10

プラスミドpAHB10(図3)は、limA遺伝子のコード領域の2/3が欠失しているpAEB2 の誘導体である。プラスミドpAEB210は、pAEB2を制限酵素Clei及びHotiで補化し、続いてマングピーン (Hung Bean)ヌクレアーゼで処理することによって構築した。サイズ6.3kbのDNAを、エチジウムブロミドで築めたアガロースゲルからパンドとして切り出した。DNAをGene Cleanキットを用いて補製し、リゲートし、そしてコンピテント大騎龍TGI に形質転換せしめた。プラスミドDNAミニ調製品を適正なクローンを買定するために用いた。

868 はpAHELIOで形質転換された大脇窗JA221 である。868 を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、リバーゼタンパク質は、pAHE2 由来のものと同量でSDS ーポリアクリルフミドゲル上及びウェスタン分析により提められたが、リバーゼ活性は検出されなかった。

## **91** 2

高レベルのLinA発現のための排棄:pCBE6 , pCBE7 , pCBE12, pCBE18及びpCBE19

limAのみが発現されるプラスミドpCBB6 (図4)を、pSJ150由来の1.17kbのCleIーSph1フラグメントをプラント来端フラグメントとして、RideIで搭化し、次いでプラント末端を作り上げるためにクレノウで処理しておいた発現ベクターpBT3a にサブクローンすることによって複製した。大陽曹棟B102はpCBB6 で形質転換させた株8L21 (DB3) pLys 3 である。

プラスミドpCBE7 (図5)は、同じ1.2 kbのClail-Sphiフラグメントを発現ベクターpt7-7 にサブクローンすることによって稼棄した。8103はpCBE7 で帯質転換されたBL21 (DE3) pLye 5 である。 B102及び8103の誘発により、約32KBの分子量のタンパク質が観察さ

プラスミドpCB812(図 6) は、pC887 の8st  $\Xi$  — 8anH I フラグメントをpACYC177にサプクローンすることによって構築した。Lin は、pSJ518 (W090/00908のFig. 3 に記載) から発現されたリバーゼに対してトランスにおいてpC8812から発現し、そしてpAB810はリバーゼ 操作をもたらしめた。

プラスミドpCBB18及び19(图7及び8)は、pCBE7 のBal II — Bashi フラグメントをpLys SのBc11部位にサブクローンすることによって構築した。Lis はpASE10由来のリバーゼに対してトランスでpCBE18及び19から発現し、リバーゼ牺牲をもたらしめた。

## 高レベルのタンパク質発現を獲得するための増殖/誘発実験

下記の通りに培養物を誘発せしめて高レベルのLipA及びLipAの両者を生成せしめた。大福面操857 (JA221/pABB2) 及び868 (JA221/pABB10) を30℃で250 rpm にて一夜増殖させた。その培養物を1: 100 に着駅し、そしてA600が0.5 となるまで30℃、250 rpm で増殖させた。次にその培養物を42℃で増殖するようにした。大陽面操 8102 (BL21 (DB3) pLys S/pCBB6)は37℃で一夜増殖させ、1:100に指収し、そしてA600が0.5 となるまで増殖させた。次いでIPTEをこの培養物に1.5 mHの最終機度となるまで加えた。15分後、リファンピシンを最終機度100  $\mu$  g /miとなるまで加えた。その培養物を37℃でインキュベートし、且つその増殖中250 rpm で振った。各培養物を誘発の60、90及び120 分目において取った。

Raser とBurgess (1980) 記載の方法により調製した。サンブルは12 %のSDS - PAGEにより分けた。電気水動後、そのゲルをトランスファーバッファー(10mMのCAPS、10%のメタノール、pH11)に20mia 後した。そのゲルを、100 %のメタノール(5~10秒)及び薬習水(2×1 min)で予備処理しておいたプロプロット上にエレクトロプロットと、次いでトランスファーバッファーに接した。エレクトロプロットをトランスファーバッファーに接した。エレクトロプロットをトランスファーバッファーに接した。第智水、200 mAで実施した。プロットをサンドイッチから取り出し、業智水、いでメタノールの中ですけいだ(5~10秒)。次にそのプロットを1%(マ/マ)の都酸、40%(マ/マ)のメタノール中のアミドブラック(0.1% マ/マ)の中で1 min 染色した。そのプロットを悪効水を頻繁に交換しながらすすぎ、異範し、次いで減低の層の間で一20でで保管した。LimA及びプレリパーゼに相当するバンドを切りし、そしてApplied Blosystems 477A タンパク質シーケンサーで直接配列決定した。

下記の配列が得られた。

LieA (pCBE6): TARGGRAPL-RRAVVYGAVG (SEQ ID NO 6)
preLipA (pAHE2): ARTHRSRVVAGAVA-AMSIA (SEQ ID NO 7)
preLipA (pARE10): ARTHRSRVVAGAV--AM-IA (SEQ ID NO 8)

N一来端メチオニンが削除されていることを除き、その配列は DNA 配列から推定したLina及びpreLipA についての予測通りの配列 であった。

方法の棚に記載の通りに、ポリクローナル抗体を発生するために ゲル精製LinAタンパク質を使用した。

タンパク質の純度を更なるSDS - PAGE分析によりチェックした。

サンプルを、SDS ーポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びリバーゼに対して発生せしめた技血液を用いるウェスタン分析により分析した。図9及び10を参照のこと。リバーゼタンバク質はpARB2 又はpARB10のいづれかを含む株において同量で誘発されることが観察された。大多数の約95%のリバーゼが、シュードモナス セバシアより単離された成熟リバーゼより大きく、そしてそのサイズは完全プレリバーゼについて予測されるそれと一致した。マイタロタイターアッセイによってリバーゼ搭性についてもサンアルをアッセイした。リバーゼ括性は857の培養物(pARB2、1ipA+1inA)から観察されたが、868(pARB10、1ipA のみ)又は8102(pCBB6、1inA)の特養物からは観察されなかった。

糖果が示すには、リパーゼタンパク質はiimA遺伝子の存在下及び 非存在下において同量で作られるが、しかしlimAの非存在下ではリ パーゼ牺牲は彼出されなかった。牺牲リパーゼはlimA遺伝子も存在 しているとまにのみ生産された。

#### **94 4**

#### Lis 及びLia の精製

JA221/pABH2; JA221/pABH10; BL21/pLya S/pCBB6及びBL21の一度培養物を100 m1のL8培地に1:100 に特釈し、そして0.5 の00600値に増殖させた。pABB2 及びpABB10の場合における熱による誘発、並びにpCBE6 の場合におけるIPTGによる誘発を2時間実施した。次にその培養物を500 g、15分。4 でで達心した。

細胞を記載の方法により稼解せしめた。Lis タンパク質は細胞リゼートの可存性質分の中で見い出された。リパーゼは対入体において残っていることが見い出された。針入体はHarston ら(1984)より採用した方法により用意した。純粋なリパーゼ及びLis タンパク質を、針入体及び可溶性リゼート質分それぞれのSDS - PAGBを続て、

## 91

# pAHB2 及びpAHB10 LipA の変性及び再生

変性/其生実験を、pARE2 又はpARE10のいづれかに由来のLipA(封入体の中に存在)と、LieA(pCS86、そして細胞リゼートの中に存在)とにより実施した。 $60 \, \mu$  I の封入体を襟々な容量のpCB85細胞リゼート( $0 \sim 30 \, \mu$  I)と選ぜ、そして8 Mの原素の中で一緒に可棒化させた。其生は、機度の低まっていく尿素に対する遺析により実施した。実験は $5 \, \%$ のグリセロールの存在下及び非存在下で実施した。リバーゼ活性を $\rho$ Rスタットを利用して測定した。

実験結果は(下記に示す)、リパーゼ牺牲の%の上昇は、増加していくListの量の存在下での変性/再生により関復すること、及びグリセロールの存在はリパーゼ牺牲の関復に影響しないことを示唆した。

# pANS2 及びpANSIO LipA についての結果

#### 変性及び算生

サンブル	変性した LVの値	間復した し)の値 (ーグリセロール)	面接した LUの値 (+タサセロール)
pAHE2 + Q # 1 LinA	7. 5	5. 3	5. 3
####2 + 10 # ! LimA	7. 5	9. 3	8. 3
pAHB2 + 20 µ   LimA	7. 5	123	9. 0
pAHB2 +30 µ 1 Li=A	7. 5	13.2	13.5
pAHE2 +無-LimA			
IJ ₩ — ト. 30 µ 1	7. 5	5. 0	nd.
pAHB10+ 0 µ 1 LimA	0. 0	0. 0	0. 0
PAH810+10# 1 LIMA.	<b>0</b> . 0	5. 5	10.5
PAHE10 + 20 # 1 LIMA	<b>Q</b> . 0	8. 3	8. 5
PAHE10 + 30 µ 1 LimA	G. C	1 6. 0	1 1. 0
AHE10+無・LimA			<del>-</del>
リゼート、30 µ 1	0. 0	0. 0	ad.

#### #46

# pARS2 及びpANB10 Liph の変性及び再生

この一式の実験のために、針入体質分を1:10に指収した。pAHE2 及びpAWEIO (lip)對入体並びにpCBEG (Lim) 細胞リゼートのサンプ ルをSDS ーポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。変性 /再生実験において用いたタンパク質の量を同定するためにBiorad タンパク質アッセイを利用した。10 μ l の pANB2 封入体は10 μ g の タンパク質を含むことが決定された;10μ lのpAH210封入体は8 и в のタンパク賞を含んでいた;そして10 и 1 のpCBE6 リゼートは 25μεの靴タンパク質を含んでいた。

イムノブロット(図11)及びリパーゼ活性分析は、細胞外面分は 活性な成熟リパーゼのみを含み、一方、細胞内面分は不活性なアレ リパーゼのみを含むことを示した。

# タンパク音%

画分	リパーゼ活性	・プレリパーゼ	リパーゼ
細胞内	_	100	ad
細胞外	+	pd	100

LimAが大陽歯BL2I (DB3) pLys S pCBB6 の抽出物として供された とき、<u>P. セパシア</u>由来の成熟細胞外リパーゼはLiskの存在下にお いてのみ、変性/再生後に定量的に再活性化されることができた。 冏一の実験において、Linkを伴って又は伴わないで細胞内プレリバ ーゼを利用したときは、下記の裏から明らかな過りリパーゼ活性は 駆められなかった。

<u> P. セパシア</u> の報胞面分	変性前のレリ	再生後のレリ
細胞内蓋分(プレリパーゼ)		
20 µ i + 0 µ 1 Lima	0. 0	C. a
20 µ 1 + 10 µ i Li=A	0. 0	0. 0
20 µ 1 + 20 µ 1 L1 mA	0. C	0. 0
20 µ 1 + 30 µ 1 Lisk	0. 0	0. 0
20μ I + 30μ I 無-LieA リゼー	- F 0. 0	<b>0.</b> 0
細胞外面分(成熟リバーゼ)		
20 µ 1 + 0 µ 1 Li=4	1. 5	0. 0
20 µ 1 + 10 µ 1 Li = A	1. 5	0. 4
20 u 1 + 20 u i LimA	1. 5	0. 8
20 µ 1 + 30 µ   LimA	1. 5	1. 3
20 μ ! + 30 μ ! 無-LiuA リゼー	- h 1.5	0. 0

# この実験の結果は(下記に示す)、実性/再生反応におけるLiza の量の上昇は、リバーを活性の間復率の初期上昇をもたらすことを

未雙する。 更なる量のLimAの反応への付加は観客的である。

# pAHS2 及びpAHBIOリパーゼについての結果

対入体は1:10に着収:リゼート由来のLink

透析サ	ンア	n		国復したリバーゼユニットの値
PARE2	10#	1		0.4
p4RE2	•	+10 # 1	Link	4 5. 6
pAHE2	-	+ 15 u #	Lina	1 5. 7
PANE2		+ 20 # 1	Lima	1 4. 5
pAHB2	•	+ 30 # 1	Lina	9. 5
pARE2	•	+ 40 # 1	LinA	3. 2
PAHE10	10	u I		0. 0
PARE10	•	+10 # [	Lina	2. 5
PASE10		+ 15 # [	Lina	7. 8
PAHE10		+ 20 # 1	LinA	7. 3
PARE10	•	+30 # 1	Lina	3. 5
PARE10	•	+40 # 1	Liwa	0. 5

## 例 7

<u>シュードモナス セパシア</u> BSN 3959由来のリパーゼ及びアレリパ -#

P. セパシア DSH 3959(それよりlipA及びlimAをクローンした 株)を誘発して、80g/1のオレイルアルコールを添加したLB培油 の中での増殖によりリバーゼを生産させ、次いで細胞外、ベリブラ ズマ及び報胞内質分をNew とReppel (1985) に記載の通りに単離し

再生実験中でのLinkによる、<u>P. セパシア</u>由来のプレリパーゼで はなくリパーゼの活性化は、大腸瘤の中で生産されたリパーゼタン パク質を利用しての結果と一致した。大陽蘭リパーゼサンプルは約 5 %の成熟タンパク質及び95%のプレリパーゼより成る。変性前 (pARE2 のみ)及び再生後 (pARE2 及びpARE10) に観察されたリパ ーゼ活性の値は、SDS ーPAGEで認められたリパーゼタンパク質の蛇 量より予測される値のほぼ5%に相当した。

# **94** 8 放熟LipAタンパク質の発現のための構築

シグナルペプチドを欠く形態、即ち成熟リパーゼとしてリパーゼ LipAが発現されるプラスミドを構築した。これらは成熟リパーゼを エンコードするlipA遺伝子の改変パージョン、それに続くlimA遺伝 子を含むpARB19(図12)、及びlimA抜きの成熟リパーゼをエンコー ドするpANE22(閏13)である。それらは下記の通りに構築した:

下記のDNA フラグメントを合成した(複雑方法):

(Mlul) (Hindill

5 ' - CGCGTAAGCTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAATCATGGCC -

3' - ATTCGAAGTETAACTTTCCCCTCCTCTTAGTACCEG -

(Hiel)

GCTGGCTACGCGGCGA - 3 ' (SEQ ID NO 9)

CGACCGATGCGCCGCTGCGC - 5 ' (SBQ ID NO 10)

このDNA フラグメントは基本的には、<u>パチルス リシュニホルミ</u> ス amyLリポソーム結合部位及び開始コドンを、成熟LipAタンパク 萱のN末礁由来のアミノ酸AAGYAA (SEQ 10 NO II) をエンコードす る配列の前に合む。

このBNA フラグメントを、Mlul消化pSJ420 (NOSO/OOSO8に記載の pSJ416と周一)にリゲートし、そしてpSJ838をプラスミドとして単 離した。その中の合成DHA フラグメントにおけるWind I 都位は pSJ420上のamyLプロモーターに近位する。

pSJ83BはmayLプロモーター、mayL RBS 、lipAの最初の8コドン に融合したamyLシグナルペプチド、amyL RBS 、成級lipA及びlimA を保有する。

pSJ838からの組換により(Jorgensen ら、1990に本質的に配電の 退り)プラスミドpSJ897を確停し、これはamplプロモーター、ampl RBS 及び成熟iipA、それに続くlimiを含む。pSJ897上のampl RBS からのすぐ上流に観察酵素Ndelに関する経識配列がある。

pAIE19を、pJM2の4.9kbのNdel-BcoRI フラグメント、pSJ897の 0.46kbのNdel-BaeRI フラグメント及びpSJ150の2.07kbのBaeRI -EcoRI フラグメントのリゲーションにより構築した。

pABB22をpABB19から、Clai+Notl情化及びリゲーション、それに 続く末端をブラント化するためのエクソヌクレアーゼS1処理により 構築した。

勝発に軽、pABB22を含む大路窗JA221 からではなく、pABB19を含む大路窗JA221 からリパーゼ活性が認められた。

Lisaを伴う及び伴わないでの成熟Lipaの変性及び其生

成熟リパーゼを、方法において記載した細数の誘発、値収及び溶解を経た可溶性面分として用意し、そして方法において記載した通り、List合有細胞リゼートの存在下及び非存在下での変性/再生実験において利用した。

この実験の結果(下記の表)、Limikの存在下で大腸面で生成された成熟Lipikのみが、衝性リパーゼ酵素をもたらしめるように再生されらることを示した。

## ンから3塩基対下流に位置する。

lipDをエンコードするDNA 配列をSEQ (D NO 1 に、そしてSEQ ID NO 3に対応のタンパク質配列を示す。lieDをエンコードするDNA 配列をSEQ ID NO 4 に対応のタンパク質配列を示す。

LipAとLipDのアミノ酸配列の整合研究より、lipDアミノ酸配列が 推定できない 5 つの箇所に加えて、酵素の成熟部において22箇所の 相違があった。

LiuAとliuBのアミノ酸配列の整合研究により、liuBのアミノ酸配列が推定できない 2 つの箇所に加えて、32箇所の相違があった。

これらの研究に基づき、lipDとLipA、及びlinDとLinAは相同性ではあるが、しかしながら異なるリパーゼ及びリパーゼ頃節因子タンパク質であることが明らかとなった。

使って、LinAが変性/再生実験においてlipDを牺牲化できるかが 護鹿となった。

# **91** i i

# P. セパシアから精製したlipBによる変性/再生実験

. 株7510-A(=03H 3401)由来のIleDを、標準のタンパク質精製法を利用して、DSH 3401からの部分精製タンパク質として用意した。

LiaAの存在下及び非存在下で、株7510-Aの由来のリパーゼを用いて変性/再生実験を行った。18Lisを、機 \* な比のLieAにより変性及び再生し、そして回復リパーゼ悟性を測定した。リパーゼ悟性はpif スタットで測定した。コントロールとして、原素の非存在下でも実験を行った。

結果が示すには、7510-AリパーゼをLisAの非存在下で変性及び再生すると、リパーゼ語性は有効に固復しなかった。高めたレベルのLisAを7510-Aリパーゼに加えると、高められたレベルのリパーゼ活

pABB19:成熟LipA, LiuA, nABB22:成熟LipA,

	変性前のい	変性後のLli
pARB19(100 ar 1 )	0. 5	0. 5
pAH819(100 # 1 ) + Lima (10 # 1 )	0. 6	0. 5
pAHE19(100 # 1 ) + LimA (20 # 1 )	0. 5	0.75
pAME19(100 # 1 ) +LimA (30 # 1 )	0. 5	0.75
pAHE19(100 μ 1 ) +無-LimA リゼー!	0.5	0. 25
(30 # 1 )		
pARE22(100 # 1 )	0.0	0. 0
pAHE22(100 # 1 ) + LimA (10 # 1 )	Q. O	0. 5
pASB22(100 # 1 ) + LimA (20 # 1 )	0. 0	0.75
pARE22(100 # 1 ) + LimA (30 # 1 )	0. 0	0.75
pANE22(100 µ 1 ) +無-LimA リゼー	P 0. 0	0. 0
(30 u 1 )		

#### **94**10

<u>P. セパシア</u>DSN 3401からのilpd及びlimDのクローニング及び配列 株75-10A とも呼んでいる<u>P. セパシア</u>、DSN 3401の別の単離体 は、DSN 3959由来のLipAに額似なリバーゼを生成する。

DSM 3401由来のリパーゼエンコードDMA のクローニング及び配列 快定(M090/00908に記載の標準方法を採用)は、lipA及びlimAに対 して比較的高い相関性を育する以降lipD及びlimDと呼ぶ二本の遺伝 子を示した。

極端なるDNAのGC含有に基づき、その配列は決定することが困難であり、従っていまだに部分的に未決定な配列が残っている!lipD 遺伝子における 4 位、及びLieD 遺伝子における 2 箇所の位置。

lisD開始コドンは、lipA及びlisAの場合のように、lisD停止コド

性が認められた。しかしながら、固復したリバーを活性の%は非常 に低いままであった。

# 7510-4リパーゼについての結果

13,000LU/mlのストックを使用;リゼート由来のLimA

サンブリ	レはi	查析			LUの値 変性	回復した LUの値 (+URBA)	% 茴 復 率
7510A 1	5 #	1			. 18	0.25	1. 4
75104		+ 5 #	1	Link	18	0.25	1. 4
7510A	•	+ 10 #	ı	Lina	18	0.4	2. 2
7510A	,	+ 15 #	ı	Lina	18	0.35	20
75104	•	+ 30 #	ì	LinA	18	0.45	2. 5

リバーゼ活性の低い回復率についての最明は後にする。特定の調製品中のリバーゼは、変性/再生の際に劣化することが認められ、従って実験を、DSM 3401由来のリバーゼ及び構発したBL21 (DE3) pLya S pCBB6由来のLimAの新たな部分精製調製品で繰り返した。以下の結果は、LimAがlipDをよく活性化できることを示す。

	要性前L0	再生後に	% 原復率
11p0 (10 µ I) + .	80	0.1	0.08
11pD (10 # 1 ) + 5 # I LimA	80	44	35
11pD (10 µ 1 ) + 10 µ l LimA	80	45	36
lipD (10 µ l ) + 20 µ l timA	80	56	45
lipB (10 # 1 ) + 30 # 1 LimA	80	55	44
lipD (10 µ l ) + 40 µ l LimA	80	53	42

## **#**12

## lipDの発理のための構築

LipA配列は成熟LipA配列における7個のアミノ酸に対応する位置

においてHisi部位を、そしてlip4停止コドンの後にClai部位を含む。 IipD配列は同じ位置にHisi及びClai部位を含む。

従って、プラスミドは前者のlipA発現ペクターに基づき、ハイブリドタンパク質の発現を可能とするために、lipA Miul-Clalフラグメントの代りに、成熟タンパク質における最初の 7 個のアミノ酸のみがLipAに由来しており、一方、成熟タンパク質の残りがlipBに由来しているlipB Miul-Clalフラグメントの挿入により簡単に構築できうる。

pARE16 (図14) はLipAーlipDハイブリドリパーゼをLimAと共に発現し、そして前述の通りのMlulーClalフラグメントの交換により pARE2 から構築されたものである。pAEE23 (図15) はLipAーlipBハイブリドリパーゼのみを発現し、そしてLim タンパク質は発現しないる。これはpARE16より、LimAのClalーKotlフラグメントの欠失により構築されたものである。

#### **#**13

lipk-lipBハイブリドリパーゼの変性/再生

pAHE16及びpAHE23から発現させたlipAーlipDハイブリドタンパク 質を、方法において記載の通りにLimAを加えた及び加えていない変 性/再生実験に用いた。

この実験に用いたリパーゼサンプルは、pARE16又はpARE23のいづれかを含む誘発大陽窗JA221 細胞の排解を経た可溶性質分である (誘発に基づいて大多数のリパーゼタンパク質は対人体に残っていたが、可熔性質分は若干のリパーゼをまだ含んでおり、そして対入体よりも可溶質分の中に比較的多くの皮製リパーゼがあるようであった)。

LimikはBL21 (DE3) pLys 5 pC886 の誘発培養物より得た。 下記に示す結果は、Limikが変性/再生実験においてLipikーLipiのハ

スミドを作った。lieA違伝子の始まりにおいて過常存在しており、且つpSJ721になく、そしてlip-lim 融合プラスミドにおいてないべきであるClal部位の欠失について形質転換体をスクリーンした。制限解素分析からいくつかのプラスミドが適正であることが認められた。そのうちの6個をpCBFI-6 と命名した(図16)。

大腸瘤BL21(DE3)pLya S を各融合プラスミドにより形質転換させ、次いでその形質転換体を増殖させ、そしてIPTGで誘発した。トリプチリンプレートでのプレート及び培地サンプルにおける活性をデリプチリンプレートでのプレートをび培地でありパーゼ活性をデンルを受けない。 細胞及び培地の両者に由来するタンパク質サンプルをSDS ーポリアクリルアミドゲル及び流リパーゼ流血槽を用いるウェスタン分析により分析した。サイズにおいてpABB2 又にpABB8 により生成されたプロセスを受けていないリパーゼと同一であるりが駆けた。 誘発実験のタイムコースの初期に対すシンパク質のみが検出された。 誘発実験のタンパク質の追縮がクンパク質分解を特に受け易いのであろう。

イブリドリバーゼを活性化できることを示す。

	変性前のい	再生後のLi
PAHE16 (30 W 1 ) +	0. 5	0. 5
pARE16 (30 µ 1 ) + LimA (10 µ 1 )	0. 5	0.75
PARE16 (30 # 1 ) + LimA (20 # 1 )	0. 5	0.75
pARE16 (30 µ 1 ) + LimA (30 µ 1 )	0. 5	0.75
pARB16 (30 # 1 ) + LtmA (40 # 1 )	0. 5	1. 0
pAHB16(30μ1)+無-LimA 細胞リゼー	· F 0.5	0. 5
(40 µ 1 )		
PARE23 (30 µ 1 ) +	0. 0	0, 0
pARE23 (30 # 1 ) + Li=A (10 # 1 )	0. q	0.75
pAHE23 (30 µ 1 ) + LimA (20 µ 1 )	0. 0	0.75
PARE23 (30 # 1 ) + LimA (30 # 1 )	0. 0	1. 0
pAHE23 (30 # 1 ) + LimA (40 # 1 )	0. 0	1. 0
pANH23(30 m l )+無-LimA 細胞リゼー	F 0.0	0. 0
(40 µ 1 )		

#### **9414** .

#### lip-lim 数合体の構築

プラスミドpSJ721はpSJ377の欠失機準体であり、その15bpはClaif 部位において欠失しており、LipAの停止コドン及びlim の最初の3個のアミノ機についてのコドン(Jorgensen ら、1981)を欠いている。従って、pSJ721は、LipAのC来端においてのSpbi部位に終く8個のアミノ機に融合されたLim タンパク質をエンコードする。pJJ721の838 bpのSpbiーNot!フラグメント(これはlim の大部分に融合したlip のC未満を含む)及びpSJ150の915 bpのMiuiーSpbiフラグメント(これはリゼートコード配列の大部分を含む)を、Miwi 及びMot!で消化しておいたpABBS にリゲートし、lip-lim 融合プラ

## 文制

Clarke, L. and Carbon, J. (1978) J. Mcl.. Sicl. 120, 517-534. Ellis, R. J. & van der Vies, S. H. (1991), Annual Review of Biochemistry 50, 321-347.

Hager, D. A. and Borgeas, R. R. (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulphate, and repaturation of ensymmtic activity: results with signs subunit of Escheria coli 2NA polymerase, wheat germ DNA topolsomerase and other enzymes. Anal. Biochem. 109, 75-86.

Jorgensen, S., Skov. K. M. and Diderichsen, B. (1991) Cloning, sequence and expression of a lipsas gene from <u>Presidences</u>. Capacis: lipsase production in heterologous houts requires two Pseudomonass genes. J. Bacteriol. 173, 559-567.

Maraton, F. A. O. (1987) The purification of sukaryotic polypeptides expressed in <u>B. coli.</u> in DNA Cloning:

A practical approach (ed D. M. Glover), vol. 3, p. 59, IRL Press, Oxford.

Marston, F. A. O., P. A. Lowe, M. T. Doel, J. M Schoemaker. 1984. Parification of calf prochymosin synthetized in  $\underline{B}$ , coli. BioTechnology 2: 800 .

Rosembers, A. R., Chui, D. S., Liu, S.-M., Duan, J. J., and Studier, P. N. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. Gene 56 125-135.

Sambrook, J., Fritach, B. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory sanual. 2nd edition

Valtukaitis. (1981) Methods in Boxymology 21, 46-52

Mang. R., McConneil, B. J. and O. Mahony, D. J. (1990) Amefficienttemperature-inducible vector incorporating the T7 gens 10 translation initiation leader region. Nucleic Acids Rev. 18, 1070.

New, H. C., Heppel, E. A. (1965), J. Biol. Chem. 240, 3685-3692.

Jorgensen, P. L., Hansen, C. K. Poulsen, G. B., Diderichsen, B. (1990), Gene, 96, 37-41.

- S. Aoyama &, <u>FRES Letters 242</u> (1), December 1988, pp. 36-40 W. Kustalya &, <u>Biochem. Biophys.</u>, <u>Res. Comm. 141</u> (1), November 26, 1988, pp. 185-190
- R. J. Ellis and S. M. Hemmingson, <u>Trends Blockes</u>, Sci. 14. 1989, pp. 339-342;
- J. B. Rothman. Cell 59, 1989, pp. 591-601
- R. Morimoto & in <u>Stress Projeins in Biology and Medicine</u>, R. Morimoto & eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Rerbor, NY, 1990, pp. 1-36)

Sambrook 6, Molecular Closing : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989

S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, <u>Tetrahadron Letters 22</u>, 1981, pp. 1859-1869,

Matthes 6, EMBC Journal 3, 1984, pp. 801-805

# 以下の配列表において

SEQ ID NO 1 はlipDのスクレオチド配列であり;

SEG ID NO 2 はlimbのメクレオチド配列であり;

SEQ 1D NO 3 はlipDのアミノ酸配列である。その配列はプレリバーゼのそれであり、成熟リバーゼの第1アミノ酸残蓄はAである(アミノ酸残蓄(5)。

SEQ ID NO 4 はlimDのアミノ酸配残であり:

SEQ ID MO 5 はlip-lim 融合遺伝子のスクレオチド配列であり; SEQ ID MO 8-8 は例4に説明したペプチドフラグメントであり; そして

SEQ ID NO 9-11は例 8 に示すヌクレオチド及びアミノ酸配列である。

# 配 列 表

- (1) 一般情報:ノポ ノルディスク A/S
- (1)出層人:
  - (A)名称:ノボ ノルディスク A/S
  - (B) 通り:ノボ アレ
  - (C)市 : バグスパード
  - (E) 雷 :デンマーク
  - (F)郵便番号:DK-2880
  - (G)電話:+45 4444888
  - (H) テレファックス: +45 (449 3256
  - (1)テレックス : 37304
- (ii) 発明の名称:活性リパーゼの製造のための方法
- (前)配列の数:11
- (iv)コンピューター読み取り方式:
  - (A) 媒体のタイプ : フロッピーディスク
  - (B) コンピューター: IBM PC コンパチブル
  - (C)作動システム : PC-DOS/MS-DOS
  - (D) ソフトウェアー: パテントイン リリース# 1.0 、 パージョン#1.25 (BPO)
- (vi)先の出職のデーター:
  - (A) 出職番号: WO PCT/BK91/80402
  - (B) 出版日 : 1991年12月20日
- (2) SEQ 10 NO:1 についての情報:
  - (1)配列の特徴:
    - (A)長さ:1092 塩基対
    - (B) 種類: 核酸
    - (C) 額の数:一本額

- (D)トポロジー:直額
- (li )分子の型:DNA (ゲノム) (si )ハイポセティカル:NO
- (ヨ)ハイホモティルル:
- (丑)アンチセンス:KO
- (∨)フラグメントの型:内部
- (vi) 超源:
  - (A)生物:シュードモナス セパシア
- (B)株 : DSM 3491
- (xi) 配列の幹細: SBG ID NO: 1:

(*., =.,	,,				
ATEGCCAGAT	CGATGCGTTC	CAGGGTGGTG	GCAGGGGCAG	TGGCATGCGC	50
GATGAGCGTC	GCGCCGTTCG	CGGGGGGGAC	CSCGSTGATG	ACGCTTGCGA	100
CGACGCACGC	GGCGATEGCG	GCGACCGCGC	CCGCCGACGA	CTACGCGACG	150
ACECETTATC	CGATCATECT	CGTGCACGGG	CTCACGGGTA	CCGACAAGTA	200
CGCGGGCGTG	CTCGAGTACT	<b>EGTACGECAT</b>	CCAGGAAGAC	CTGCAGCAGC	250
ATGGCGCGAC	CGTCTACGTC	GCGAACCTGT	CGGGCTTCCA	GAGCGACGAC	300
GGGCCGAACG	GGCGCGGCGA	ACAGTTGCTC	GCGTACGTGA	AGACGETECT	850
CGCEGCGACG	GGCGCGACCA	AGGTCAATCT	CGTCGGCCAC	NCGCAGGGCG	400
GGCTCACGTC	GCGTTACGTT	GCGGCTGTCG	CGCCCGATCT	CGTCGCGTCG	450
GTGACGACGA	TOGGCACGCC	GCATCGTGCX	NCCGAGTTCG	CCGACTTCGT	500
GCAGGGCGTG	CTCGCATACG	ATCCGACCGG	GCTTTCGTCA	TCGGTGATCG	550
CGGCGTTCGT	CAATETETTC	GGAATCCTGA	CGAGCAGCAG	CCACAACACG	600
AACCAGGACG	CACTOGOGIC	GCTGAAGACS	CTGACGACCG	CCCAGGCCGC	650
CGCGTACAAC	CAGAACTAIC	CGAGCGCGGG	CCTCGGTGCG	CCGGGCAGTT	700
GCCAGACCEG	CHRICCGACG	GARACCGIGC	GGTHCAACAC	GCATCTGCTG	750
TATTCGTGGG	CCGGCACGEC	GATCCAGCCG	ACGCTCTCCG	TGTTCGGTGT	800
CACEGGCGCG	ACGGACACGA	GCACCATTCC	GCTCGTCGAT	CCGGCGAACG	850
CGCTCGACCC	GTCGACGCT1	GCGCTGTTCG	GCACGGGCAC	GETGATGATC	900

```
ARCCGCGGCT CGGGCCCGAA CGACGGGCTC GTATCGAAGT GCAGCGCGCT
                                                                                                  转表平7-504561 (16)
                                                                   GEGARACTEC ECGATECESE CECEGTEGAC AAGTECEGACE TEGGEGEGET 500
  STACGGCCAG STECTGAGCA CGAGCTACAA GTGGAACCAT ATCGACGASA
                                                                    GCAGCTCGCG CTCGACCAGC GCGCATCGAT CGCGTATCGC ACGCTCGCCG
  TCAACCAGTT GCTCGGCGTG CGCGGCGCGA ATGCGGAAGA TCCCGTCGCG
                                                                   ACTGGAGCCA GCCGTTCTTC GCCGCGGAGC AGTGGCGGCA GCGCTACGAT
  STEATCOGGA CGCATGCGAA CCGGCTGAAG CTGGCGGGCG TG
                                                                                                                           600
                                                                   CTCGCGCGGC TGAAGATCGC GCAGGATCGC ACGCTGACCG ATCCGCAGAA
  (2) SEQ IB NO:2 についての情報:
                                                                   GGCCGAACGG CTCGCGGCG TECAGCAACA GATGCCGGCC GAGGAACGCG
    (1)配列の特徴:
                                                                                                                           700
                                                                   CGGCTCASCA SECGGTCGAC CEGCAGCGGG CCGCGATCGA CGAGAGTCCG
      (A)長さ:1032 塩基封
                                                                   HAGTTGCAGA AGAGCGGGAC GACGCCCGAT GCGATGCGCG CGCAACTGAC
      (B)種類:核酸
                                                                   GCAGACGCTC GGGCCCGAGG CCGCCGCGC CGTCGGCCAG ATGCAGCAGG
      (C) 質の数: 一本額
                                                                   ACGREGEATE GIGGEAGAGN CECTACGEGG ACTAIGEGGE GEAGEGEGEG
      (D)トポロジー:直鎖
                                                                   CAGATCGAGT CGGCCGGCCT GTCGCCGCAG GGCCGCGACG CGCAGATCGC
    (fl)分子の覆:DNA (ゲノム)
                                                                   CGCACTGCGG CAGCGCGTGT TCACGAAGCC CGGCGAAGCC GTECGCGCGG 1000
    (音)ハイポセティカル:NO
                                                                   CGTCACTCGA TCGCGGGGCG GGCAGCGCGC AG
   (音)アンチセンス:NO
                                                                   (2) SBQ ID NO:3 についての情報:
   (V)フラグメントの型:内部
                                                                     (1)配列の特徴:
   (v() 起海:
                                                                       (A) 長さ:364 アミノ酸
     (A) 生物:シュードモナス セパシア
                                                                       (B) 雑菓:アミノ敷
     (B) 株: DSN 3401
                                                                       (C)額の数:一本額
   (xi) 配列の幹細: SEG ID NO: 2:
                                                                       (D)トポロジー:直額
ATGGCGGCAC GTGAAGGGCG CGCGCCGCTG GCGCGCGCGC CTGCAGTCTA
                                                                     (目)分子の型:タンパク賞
CGGTGTCGTG GEGCTGGCGG CGATCGCCGG CGTCECGATE TGGAGCGGGG
                                                                     (w)ハイポセティカル:NO
CGGGATGGCA TCGCGGTACG GGTAGCGTCG GCGAAGCGCC CGATGCGGCG
                                                                     (w)アンチセンス:ND
GCAGTEGGCE GCGTEGCTEC EGCACCGCCE CAGGCCGCCC TGCCGGCGAG
                                                                     (∨)フラグメントの型:内部
CGCGGGCCTG CCGTCGTCGC TGGCCGGCTC CAGCGCGCCC CGCGTGCCGC
TOGATGOGGE COGCOATOTO GOGRAGGIEC GOGCOGTECE COATITOTIC
                                                                       (A) 生物:シュードモナス セパシア
GACTACTECC TGACCECGCA GAGCGACCTC AGTGCGGCCG CGCTCGATGC
                                                                       (B)株:BSM 3401
ACTCGTCGTG CGCGAGATTG CCGCGCAGCT CGACGGCACG GCGGCGCAGG
                                                       400
CCGAGGCGCT CGACGTGTGG CATCGCTATC GTGCGTATCI CGACGCGCTC
   (xì) 配列の詳細:SEQ ID NO: 3:
                                                                  The Ala lie Gin Pro The Lew Ser Val Phe Gly Val The Gly Ala 260 265 270
Met Ala Arg Ser Het Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ala Val Ala
1 15
                                                                 The Asp The Ser The IIe Pro Leu Vel Asp Pro Ala Ass Ala Leu 275 \\ 280 \\ 285
Cys Ala Het Ser Val Ala Pro Phe Ala Gly Ala Thr Ala Val Het 20 \  \  \, 30
                                                                 Amp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Phe Gly Thr Gly Thr Val Het IIe
290 295
The Leu Alm The The Him Alm Alm Het Alm Alm The Alm Pro Alm 35
                                                                 Ask Arg Gly Ser Gly Pro Ask Asp Gly Lew Vel Ser Lys Cys Ser 305 $310\ 
Asp Asp Tyr Ala Thr Thr Arg Tyr Pro IIe IIe Leu Val His Sly 50\,
                                                                 Ala Leu Tyr Gly Gla Vel Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asm Bla
320 325 330
Low the Gly The Asp Lya Tyr Ala Gly Wal Lee Glu Tyr Trp Tyr \frac{1}{75}
                                                                 Ite Asp Giu Ile Asa Gin Lee Leu Gly Val Arg Gly Ala Asa Ala
335 340
Gly lie Glo Glu Asp Leu Glo Glo Ris Gly Ala Thr Val Tyr Yal
85 90
                                                                 Glu Asp Pro Val Ale Val Ile Arg Thr His Ale Asa Arg Leu Lys
350 355
Ala Asn Leu Ser Gly Phe Gln Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly Arg
95 105
                                                                 Leu Ala Gly Val
Gly Glu Gln Leu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Vai Leu Ala Ala Thr
110 120
                                                                  (2) SEG [B NO:4 についての情報:
                                                                    (1)配列の特徴:
Gly Ala Thr Lya Val Asn Leq Val Gly His Xaa Gln Gly Gy Leu 125\, 130\,
                                                                     (A) 長さ:344 アミノ酸
The Ser Arg Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala Ser 140 145
                                                                     (B) 種類:アミノ酸
                                                                     (C) 額の数:一本館
Wal The The Ile Gly The Pro His Arg Xaa Kaa Glu Pho Ala Rap
155 160
                                                                     (D)トポロジー:直額
Phe Val Gin Gly Val Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser Ser 170 175
                                                                   (i)分子の型:タンパク質
                                                                   (誰)ハイポセティカル:NO
Ser Val lie Ala Ala Phe Val Asm Val Phe Gly Ile Leu Thr Ser
185 190
                                                                   (E)アンチセンス:NO
Ser Ser His Asm Thr Asm Glm Asp Ale Leu Ale Ser Leu Lye Thr
200 205 210
                                                                   (V)フラグメントの型:内部
Les Thr Thr Ais Gln Als Als Als Tyr Asn Gln Asn Tyr Pro Ser 215 \ \ 220 \ \ 225
                                                                     (A) 生物:シュードモナス セパシア
                                                                     (8) 株 : DSN 340I
Ala Gly Lau Gly Ala Pro Gly Ser Cys Gla Thr Gly Xaa Pro Thr
230 240
                                                                   (xi) 配列の詳細:SEQ ID NO: 4:
Gis Thr Val Arg Rea Asn Thr His Lou Lou Tyr Ser Trp Ala Gly 250 255
```

Het Ala Ala Arg Glu Gly Arg Ala Pro Leu Ala Arg Arg Ala Ala 10 15

Val Tyr Gly Val Val Gly Leu Ala Ale Ile Ala Gly Val Ala Het 25Trp Ser Gly Ala Gly Trp His Ars Gly The Gly Ser Val Gly Glu  $45\,$ Ala Pro Asp Als Als Als Val Gly Gly Vel Als Als Als Pro Pro 50 Gin Aim Ais Val Pro Als Ser Als Gly Leu Pro Ser Ser Leu Aim 75Gly Ser Ser Ala Pro Arg Val Pro Leu Asp Ala Gly Gly His Leu 90  $\phantom{\bigg|}$ Als Lys Val Ars Ala Val Ars Asp Phe Phe Asp fyr Cys Lau Thr  $105 \ \ 100$ Ala Gln Ser Asp Leu Ser Ala Ala Ala Leu Asp Ale Leu Val Val 110 115 Arg Giw lie Ala Ala Gia Leu Asp Giy Thr Ala Ala Gia Ala Giu 125 130 Ala Leu Asp Yla Trp His Arg Tyr Arg Ala Tyr Leu Asp Ala Leu 140 145 Ala Lys Lew Ars Asp Ala Gly Ala Val Asp Lys Ser Asp Leo Gly 165 160 Ala Leu Gin Leu Ala Leu Asp Gin Arg Ala Ser Ile Ala Tyr Arg 175 175 180 Thr Les Gly Asp Trp Ser Gla Pro Phr Phe Gly Ala Glu Gin Trp 195 Arg Sin Arg Tyr Amp Lou Ais Arg Lou Lys ile Ais Gin Asp Arg 200 205 The Leu The Asp Als Gin Lya Ala Giu Arg Leu Ala Ala Leu Gia 225Gin Glo Met Pro Ale Asp Glu Arg Ale Ale Glo Glo Ale Vel Asp 230 235 Arg Gin Arg Ala Ala lie Asp Gin Ser Pro Xas Leu Gin Lys Ser 255 250 Gly Thr The Pro Asp Ala Met Arg Ala Gin Leu Thr Gin Thr Leu  $260\,$   $270\,$ Gly Pro Glu Ala Ala Are Val Gly Glo Met Glo Glo Asp Asp 275 280 特裏平7-504561 (16)
Ala Ser Trp Gla Xan Ars Tyr Ala Asp Tyr Ala Ala Gla Ars 41a 300
Gla Ile Glu Ser Ala Gly Leu Ser Pro Gla Sly Ars Asp Ala Gla
Tle Ala Ala Leu Ars Gla Ars Val Phe Thr Lya Pro Gly Gla Ala
Val Ars Ala Ala Ser Leu Asp Ars Gly Ala Gly Ser Ala Gla

(2) SEQ ID WO:5 についての情報:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:2118 堪基対

(B) 種類:核酸

(C) 镇の数:一本額

(D) トポロジー: 直領

( Ni ) 分子の型: DNA (ゲノム)

(単) ハイポセティカル:NC

(当) アンチセンス:NO

(v)フラグメントの型:内部

(xi)配列の詳報:SEQ [D NO: 5:

ATGECCAGGA CGATECETTC CAGGETGETG GCAEGGGCAG TGGCATGCGC 50
GATGAGCATC GCGCCGTTCE CGGGGGACC CGCGGTGATE ACGCTCGCGA 100
CGACGCACCC GCCAATGCCG GCCACCGCCC CCGCCGCTGS CTACGCGCCG 150
ACGCGTTACC CGATCATCCT CGTGCCACGGG CTCTCGGGTA CCGACAAGTA 200
CGCCGGCCGG CTCCAGGTATT GGTACGGCAT CCAGGAGGAC CTGCAACAGA 250
ACGGTGCGAC CGTCTACGTC GCGAACCTGT CGGGTTTCCA GAGCGACGAC 300
GGCCCGAACG GGCGCGGCGA ACAGTTGCTC GCTTACGTCA AGACGGTGCT 350
CGCGCCGACG GGGGCGACCA AGGTCAATCT CGTCGGTCAC AGCCAGGGCG 400
GCCTCTCGTC GCGCTATGTT GCTGCCGTCG CGCCCGATCT CGTTGCGTCG 450
GTGACGACGA TCGGCCCAGC CGATCGCGGC TCCGAATTCC CCGACTTCGT 500

GCAGGACGTE CTCGCGTACG ATCCGACCEG GCTTTCGTCA TCGGTGATCG CCGCGTTCGT CARTGTGTTC GGGATCCTGA CGAGCAGCAG CCACACACC AACCAGGACG CGCTCGCCGC ACTGCAGACG CTGACCACCG CACGGGCCGC CACGTACAAC CAGAACTATC CGAGCGCGGG CCTGGGTGCG CCGGGCAGTT SCCAGACCES TECECCEACC GARACCETCS GCGGGAACAC GCACCTGCTG TATTCGTGGG CCGGCACGGC GATCCAGCCG ACGCTCTCCG TGTTCGGCGT CACGGGGGG ACGGACACGA GCACCCTTCC GCTCGTCGAT CCGGCGAACG TECTOGACCT GTOGACGOTO GCGCTGTTCG GCACCGGCAC GGTGATGATC ARCCGCGGCT CCGGGCAGAA CGACGGGCTC GTGTCGAAGT GCAGTGCGCT CTACGGCAAG GTGCTGAGCA CGAGCTACAA GTGGAACCAC CTCGACGAGA 1000 TCAACCAGCT GCTCGGCGTE CGCGGCGCGT ATGCGGAAGA TCCCGTCGCG 1050 GIGATOCGCA CECATGCGAA COGGCTGAAG CTGGCGGGGG CACGAGGAGG ACGCCCCCC CTCGCCCCCC CCCCCCTGGT CTATGGTGCC GTGGGGCTGG 1150 CEGCGATIGC CEGCGTGGCG ATGTGGAGCG GCGCGGGCCG GCATEGCGGG ACGGGCGCAT CCGGCGAGCC GCCGGATGCG TCGGCGGCAC GCGGACCGGC 1250 TGCCGCACCG CCGCAGGCCG CCGTGCCGGC AAGCACGAGC CTGCCGCCGT CGCTCGCCGG CTCCAGCGCG CCCCGCTIGC CGCTCGATGC CGGCGGCCAT CTCGCGAAGG CGCGCGGGT GCGGGATTTC TTCGACTACT GCCTGACCGC 1400 SCACAGGGAC CTGAGTGCGG CCGGGCTCGA TGCGTTCGTC ATGCGCGAGA 1450 TIGCCGCACA GCTCGACGGG ACCGTTGCGC AGGCCGAGGC GCTCGACGTG 1500 TGGCACCGGT ATCGCGCGTA TCTCGACGCA CTCGCGAAAT TGCGCGATGC 1550 CGGCGCGGTC GACAAGTCGG ACCTGGGTGC ATTGCAGCTC GCGCTCGACC 1600 AGCGCGCGTC GATCGCGTAC CGGTGGCTCG GCGACTGGAG CCAGCCGTTC 1650 TTCGGTGCGG AGCAATGGCG GCAGCGCTAC GACCTCGCGC GGCTGAAGAT 1700 CECGCAGGAC CCCGCGCTGA CGGATGCGCA GAAGGCCGAA CGGCTCGCGG 1750 CECTOGRACA CCAGATGOOG GCCGACGARC GCGCCGCGCA GCAGCGCGTC 1800 GACCGGCAGC GCGCGGCGAT CGACCAGATC GCGCAATTGC AGAAGAGCGG 1850 GGGGAGGCCC GATGCGATGC GGGCACAACT GACGCAGACG CTCGGCCCCG 1900
AAGCGGCCCC GCGGTCGCC CAGATGCAGF AGGACGACGC ATCGTGGCAG 1950
AGGCGCTACG CGGACTACGC GGCGCAGCGT GCGCAGATCG AGTCGGCCGG 2000
CCTGTCGCCG CAGGATCGCG AGGCGCAGAT CGCCGCGCTG CGGCAGCSCG 2050
TGTTTACGAA GCCCGGCGAA GCCGTGCGC CGGCATCGCT CGATCGCGG 2100
GCGGGCAGGC GGCGTAA 2118

(2) SEQ IB NO:6 についての情報:

(i)配列の特徴:

(A) 長さ:19 アミノ酸

(3) 種類: アミノ酸

(C)質の数:一本額

(D)トポロジー:裏質

( ii ) 分子の型:ペプチド ( ii ) ハイポセティカル:NO

(道)アンチセンス:ND

(v)フラグメントの型:内部

(vi) 經源:

(A) 生物: シュードモナス セパシア

(B)株:DSM 3959

(xi) 配列の評糊: SBG ID NO: 6: Thr Ala Arg Gly Gly Arg Ala Pro Lou Arg Arg Ala Val Yal Tyr 1 10 15 Gly Ala Val Gly

(2) SEQ ID NO:7 についての情報:

(i)配列の特徴:

(A)長さ:19 アミノ酸

(B)種類:アミノ酸

```
(C)額の数:一本額
   (D)トポロジー:直鎖
  ( ii ) 分子の型:ペプチド
  (星)ハイポセティカル:HO
  (当)アンチセンス:NO
  (v)フラグメントの型:内部
   (A)生物:シュードモナス セパシア
 . (日)株 : DSN 3959
 (xi) 配列の詳細:SEQ ID NO: 7:
Ala Arg Thr Het Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ala Val Ala Ala I 15\,
Het Ser Ile Aiz
(2) SBS ID NO:8 についての情報:
 (1)配列の特徴:
   (A)長さ:[7 アミノ酸
   (B) 種類:アミノ酸
  (C)質の数:一本額
  (D)トポロジー:直額
 (ii)分子の型:ペプチド
 (重)ハイポセティカル:NO
```

(日)アンチセンス:NO (V)フラグメントの型:内部

(B)株:DSM 3959

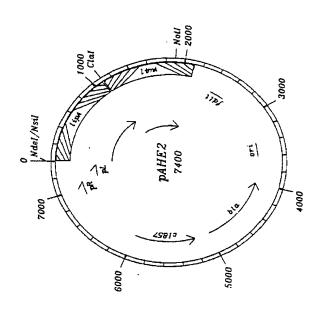
(A)生物:シェードモナス セパシア

(vi) 起源:

Ala Ala Gly Tyr Ala Ala

(x!) 配列の詳細: SEQ ID NO: 10: CECGTCGCCG CGTAGCCAGC GGCCATGATT CTCCTCCCCT TTCAATGTGA 50 56 (2) SBQ ID NO:11についての情報: (i)配列の特徴: (A)長さ:6 アミノ酸 (B) 種類:アミノ酸 (C)彼の数:一本額 (D) トポロジー: 直復 (ii) 分子の型:ペプチド (且)ハイポセティカル:NO (w)アンチセンス:NO (v)フラグメントの型:Nー末端 (4) 智強: (A)生物:シュードモナス セパシア (B)株 : DSN 3959 (zi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 11:

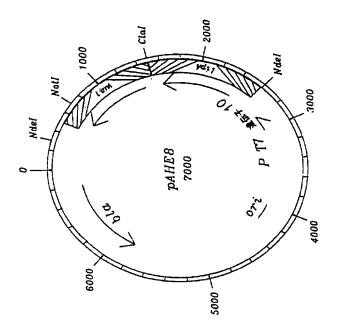
特表平7-504561 <b>(1</b> )	7)
(xi) 配列の幹報: SEQ ID NO: 8:	•
Als Ars Thr Not Ars Ser Ars Val Val Als Gly Als Val Als IO	He t
Tie Ala	
(2) SEQ ID NO:9 についての情報:	
(í)配列の特徴:	
(A)長さ:56 塩基対	
(B) 種類:抜酸	
(C) 値の数:一本額	
(D)トポロジー・宣信	
( Ni )分子の型:DNA (ゲノム)	
(※)ハイポセティカル:KO	
(目)アンチセンス:NC	
(V)フラグメントの型:内部	
(xi) 起列の詳細:SEG ID NO: g:	
CGCGTAAGCT TCACATTGAA AGGGGAGGAG AATGATGGCC GCTGGCTACG	50
CGGCGA'	56
(2) SEQ ID NO:IOについての情報:	
( i ) 起列の特徴:	
(A)長さ:56 塩基対	
(B) 種類:核酸	
(C)値の数:一本値	
(D)トポロジー:直値	
( ii )分子の型:DNA (ゲノム)	
(#)ハイボセティカル:NG	
(目)アンチセンス:YBS	



(v)フラグメントの型:内部

Fig. 1

# **特表平7-504561 (18)**



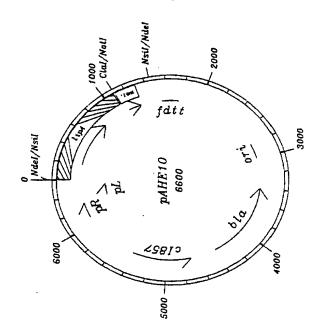


Fig. 2

Fig. 3

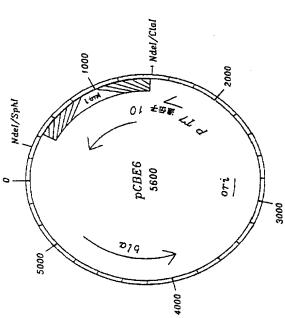


Fig. 4



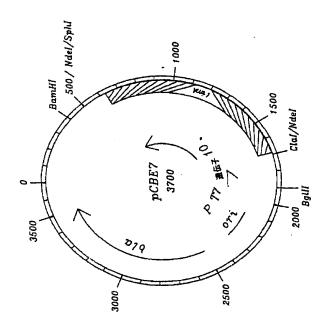


Fig. 5

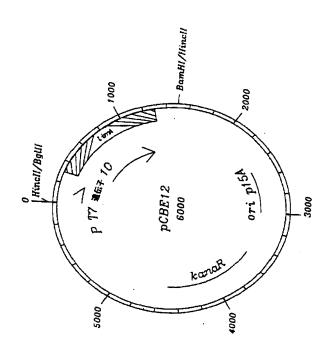


Fig. 6

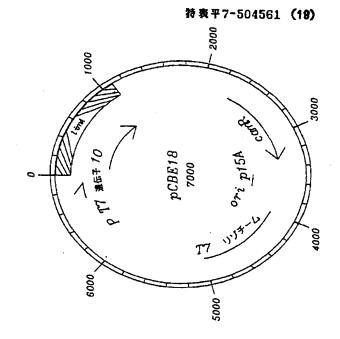


Fig. 7

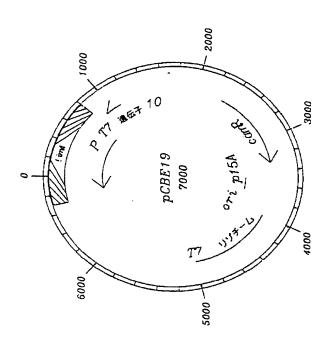
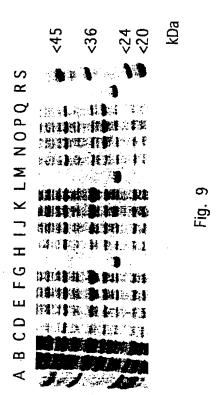
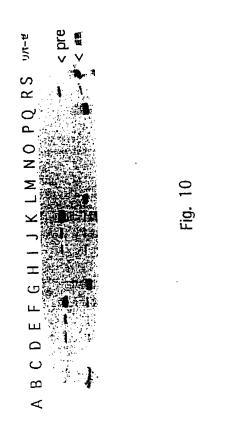


Fig. 8





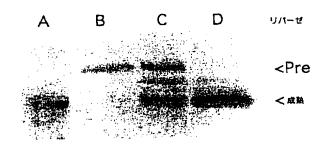
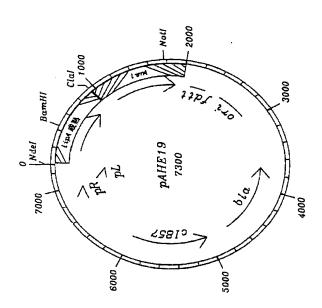


Fig. 11





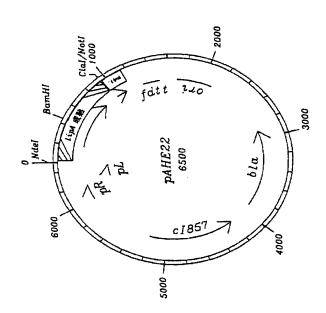


Fig. 13

# 特表平7-504561 (21)

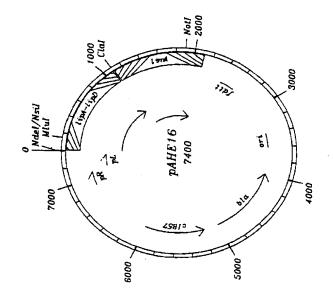


Fig. 14

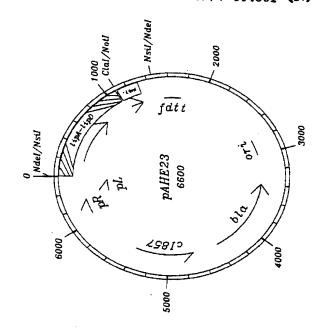


Fig. 15

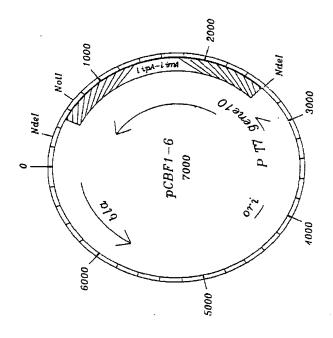


Fig. 16

# 補正書の翻訳文提出書 (特許法第184条のB)

平成6年 6 月 20日

## 特許庁長官 麻 生 渡 政

- 1 特許出職の表示
  - PCT/DK92/00391
- 2 発明の名称
  - リパーゼの製造のための方法
- 3 特許出願人
  - 住 所 デンマーク国、デーコーー2880 パグスパエルト、 ノボ アレ (番地なし)
  - 名 称 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカフ
- 4 代理人
  - 住 所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目 8 巻10 号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 電話 (3504)0721
  - 氏 名 弁理士(7751)石 田



- 1994年3月25日
- 6 添付書類の目録 補正書の翻訳文

1 温

まする.

¥091/00908号は、宿主細胞の中で発現されるポリペプチドによる 異種宿主細胞における<u>シェードモナス セパシア</u> リパーゼの生変 を開示しており、そのポリペプチドはリパーゼ生産の調節因子とし て做いている。

#### 発明の概要

意くべきことに、組換宿主細胞により生産される牺牲リパーゼ降 素の収率は、その細胞から観収されたリパーゼを変性、それに続く シャペロン(chaperone)分子の存在下での再生に付したときに高め ることが可能であることが見い出された。

従って、本発明はインピトロで活性リパーゼ酵素を製造するため の方法に関連し、この方法は

- (a) リパーゼ酵素をエンコードするDNA 配列で形質転換された 信主細胞を、そのリパーゼが不活性又は部分的に活性な状態で生産 されるのに適する条件のもとで培養し、その培養物からこのリパー ゼ酵素を面収し、次いでその固収されたリパーゼ酵素を変性に付す
- (b) この変性したリパーゼ酵素をシャペロン分子と選ぜ合わせる。 そして
- (c) 工程 (b) の混合物を再生に付して、活性リバーゼ酵素を 生成すること、

を含んで成る。

他方、本発明はインビトロで活性リパーゼ酵素を製造するための 方株に関連し、この方法は

(a) リパーゼ酵素をエンコードするDMA 配列で形質転換された 宿主細胞を、そのリパーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で

スホアミジット法により合成的に製造することもできうる。ホスホアミジット法に従うと、オリゴヌクレオチドを例えば自動DNA 合成 装置で合成し、精製、リゲートそして適宜のベクターの中にクローンする。

最後に、このDNA 精製体は合成とゲノムとの複合物、合成とCDHAとの複合物、又はゲノムとCDHAとの複合物であって、合成、ゲノム又はcDNA起源のフラグメント(適宜)を、この全DNA 構築体の様々な部分に対応するフラグメントに、標準の技術に従ってリゲートすることによって製造したものでありうる。

本発明のDNA 構築体において、リバーゼ構築体をエンコードする DNA 配列は<u>シュードモナス</u>理又は<u>クロモバクター</u>種に由来するもの であってよい。例えば、前記第一DNA 配列は、シュードモナス 立  $\frac{N + N}{N}$ ,  $\frac{N$ シュードモナス フルオレセンス、シュードモナス スタッツェリ、 シュードモナス アルカリゲンス、シュードモナス シュードアル カリゲンス、シュードモナス プチダ、シュードモナス グルメ、 <u>シュードモナス</u> <u>アエルギノーザ</u>もしくは<u>クロモバクター</u> ビスコ スム リパーゼ、又は上記のリパーゼ酵素の誘導体をエンコードす るものでありうる。前記第二DNA 配列は、<u>シュードモナス</u> セパシ ア リバーゼ調節因子、シュードモナス グルメ リバーゼ調節因 子、<u>シュードモナス アエルギノーザ</u> リパーゼ調節因子、もしく はその他の<u>シェードモナス</u> リパーゼ調節因子タンパク費、又は任 意のこれらの調節因子の誘導体をエンコードするものでありうる。 最も好ましくは、この第一DNA 配列は<u>シュードモナス</u> セパシア リパーゼ又はその誘導体をエンコードし、そして第二DNA 配列は引 用することで本明細書に組入れるW091/00908号に記載の<u>シュードモ</u> ナス セパシア リパーゼ調節因子又はそれらの誘導体をエンコー

リポソーム結合都位が先行していてよい。

本発明に従うと、シャベロン分子は<u>シュードモナス</u> リパーゼ調節タンパク質、好ましくは<u>シュードモナス セパシア</u> リパーゼ調節因子 (MOS1/00908号に開示)、<u>シュードモナス グルメ</u> リパーゼ調節因子及び<u>シュードモナス アエルギノーザ</u> リパーゼ調節因子より成る群から選ばれるもの、又は任意のかかるリパーゼ調節因子の誘導体であることが好都合である。

本明報書において、リパーゼ調節因子の誘導体は、リパーゼ酵素の誘導体に関して上記したのと同じ状況である、即ち、前記の通りに、天然リパーゼ調節因子についてコードするDHA 配列を適宜改変することにより天然リパーゼから誘導されたシャペロン活性を有するタンパク質であると理解される。この誘導体のシャペロン活性は、例えば本明細書に記載の通り、活性リパーゼ酵素の生産におけるその誘導体の能力の分析により決定されうる。

本発明にかかる方法の評価な難様において、リパーゼ降素は<u>シュードモナス セパシア</u> リパーゼ又はその誘導体であり、そしてシャベロン分子は<u>シュードモナス セパシア</u> リパーゼ調節因子(又はその誘導体)でありうる(共に、H091/00908号に開示)。

リバーゼ解素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA 配列を含んで成る本発明のDNA 精繁体はゲノム又はcDNA起揮であってよく、例えば適当な生物のゲノム又はcDNAライブラリーを用意し、そしてリバーゼ又はシャペロンの全体又は一部をコードするDNA 配列を、概単の技術に従う(Sambrookら、1989を参照のこと)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによりスクリーニングすることによって得られるものである。

本発明のDNA 精籤体は確立されている機能的な方法、例えばS. L. Beaucageら(1981)、Matthea ら(1984)により述べられているホ

プラスミドpCB87 (図5) は、同じ1.2 kbのClaI-5phlフラグメントを発現ベクターp17-7 にサブクローンすることによって構築した。B103はpCBE7 で形質転換されたBL21(BE3) pLys S である。B102及びB103の誘発により、約32KDの分子量のタンパク質が観察された。

プラスミドpCBE12(図 6) は、pCBE7 のBg1 II-Basel I フラグメントをpACYC177にサブクローンすることによって構築した。Lis は、pSJ518 (M091/00908のPis. 3 に記載) から発現されたリパーゼに対してトランスにおいてpCBE12から発現し、そしてpANE10はリパーゼ 活性をもたらしめた。

プラスミドpCBB18及び19(図7及び8)は、pCBB7 のBg1 耳ーBgmH フラグメントをpLya SのBc11部位にサブクローンすることによって構築した。Lis はpABB10由来のリパーゼに対してトランスでpCBB18及び19から発現し、リパーゼ活性をもたらしめた。例3

# 高レベルのタンパク質発現を獲得するための増殖/誘発実験

下記の通りに培養物を誘発せしめて高レベルのLipA及びLimAの両者を生成せしめた。大陽関株257 (JA221/pARB2) 及び868 (JA221/pARB10) を30でで250 rpm にて一夜増殖させた。その培養物を1:100 に特釈し、そしてA600が0.5 となるまで30で、250 rpm で増殖させた。次にその培養物を42でで増殖するようにした。大陽酸株 E102 (BL21 (DE3) pLys S/pC886)は37でで一夜増殖させ、1:100に特釈し、そしてA600が0.5 となるまで増殖させた。次いでIPTGをこの培養物に1.5 mMの最終機度となるまで加えた。15分後、リファンピシンを最終機度100  $\mu$  s  $\ell$  m1 となるまで加えた。その培養物を37ででインキュベートし、且つその増殖中250 rpm で振った。各培養物を誘発の60、90及び120 分目において取った。

特表平7~504561 (23)

再生實験中でのLIMAによる、P. セパシア由来のプレリパーゼではなくリパーゼの牺牲化は、大陽期の中で生産されたリパーゼタンパク質を利用しての結果と一致した。大陽期リパーゼサンプルは約5%の成熟タンパク質及び95%のプレリパーゼより成る。変性前(pARE2 のみ)及び再生後(pARE2 及びpARE10)に観察されたリパーゼ活性の値は、SDS ーPAGEで認められたリパーゼタンパク質の総量より予測される値のほぼ5%に相当した。

#### 成熟Lipaタンパク質の発現のための機能

シグナルペプチドを欠く形態、即ち成熟リパーゼとしてリパーゼ LipAが発現されるプラスミドを構築した。これらは成熟リパーゼを エンコードするJipA遺伝子の改変パージョン、それに続く[imA遺伝 子を含むpANB19 (図12)、及びJimA抜きの成熟リパーゼをエンコー ドするpANB22 (図13)である。それらは下記の通りに構築した:

下記のDNA フラグメントを合成した(饗埠方法):

IIIbnik) (Iulh)

5 ' - CGCGTAAGCTTCACATTGAAAGGGGAGAGGAGAATCATGGCC -

3' - ATTCGAAGTGTAACTTTCCCCTCCTCTTAGTACCGG ~

(Hisi)

GCTGGCTACGCGGGA - 3 ' (SEQ ID NO 9)

CGACCGATGCGCCGCTGCGC - 5 ' (SER IS NO 10)

このDNA フラグメントは基本的には、<u>バチルス リシュニホルミ</u> A mayLリボソーム結合都位及び開始コドンを、成熟LipAタンパク 質のN末端由来のアミノ酸AAGYAA (SEQ ID NO 11) をエンコードす る配列の前に含む。

このDNA フラグメントを、Miul消化pSJ420(M091/00908に記載の pSJ416と同一)にリゲートし、そしてpSJ838をプラスミドとして単

pAHB22: 成葉Lipk. 変性前のLU 変性後のしば pAHE19(100 # 1 ) 0.5 0. 5 pAHE19(100 # 1 ) + LimA (10 # 1 ) 0.5 0. 5 pAHE19(100 # [ ) +Li=A (20 # 1 ) 0. 5 0.75 pA#819(100 µ 1 ) + LimA (30 µ 1 ) 0. 5 0.75 paHE19(100 # 1 ) +無-LimA リゼート 0.5 0.25 (30 # 1 ) pAHE22(100 # 1 ) O. O 0.0 PARE22(100 # 1 ) + LimA (10 # 1 ) 0.0 Q. 5 pAHE22(100 p 1 ) + LimA (20 p 1 ) 0. 0 0.75 pAHE22(100 # 1 ) + LimA (30 # 1 ) 0.0 0.75 pAHB22(100 m l ) +無-LimA リゼート 0.0 0. 0 (30 # 1 )

#### **91**10

pAHSi9:成熟LipA, LimA.

<u>P. セパシア</u>DSH 3401からの1ipD及びiieDのクローニング及び配列 棟75~10A とも呼んでいる<u>P. セパシア</u>、DSH 3401の別の単離体 は、DSH 3959由来のLipAに類似なリパーゼを生成する。

DSM 3401由来のリバーゼエンコードDNA のクローニング及び配列 決定(W091/00908に記載の複準方法を採用)は、11pA及び1jaAに対 して比較的高い相同性を有する以降11pD及び1jaDと呼ぶ二本の遺伝 子を示した。

極端なるDNAのGC含有に基づき、その配列は決定することが困難であり、従っていまだに部分的に未決定な配列が残っているーIIpB 遺伝子における4位、及びIIeB遺伝子における2箇所の位置。

lieD開始コドンは、lipA及びlinAの場合のように、lipD停止コド

	電 縣 調	査 報 告	PCT/DK 92/	
A CL	ASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		PC1/DK 92/	00391
IPC5:	C12N 9/20 C12N 15/67 C12N 15/	EE C149 15 //-		
Accordi	CIZN 9/20, CIZN 15/67, CIZN 15/9 in International Point Clarification (IPC) or to be LDS SEARCHED	th merennel circumscations r	of IPC	
Moreona	n decumentation remained (examplement system follows	of by charles and		
IPCs:		,		
Desume	RESPON Married sites then meaning decommission is		-	
	FI.NO classes as above			at the felter springers
	der past contribut tatall no numerously stray (s			
			h desired 1445.	or secure servi)
	CA. HEDLINE			
C. DO	LIMENTS CONSIDERED TO BE RELEVAN	π		
Category	Citation of dominant, with indication, where	appropriate, of the rate	vant passages	Relevant to slave No
P,K	EP. A1. 0464922 (UNII EVER MY E	T At 1		5-14,16-30
	4 January 1992 (08.61.92), page 4 lines 15-25	see page 3 11m	m 14-23,	1, 10 -31
				•
x				1
•	Journal of Becteriology, Volume January 1991, Steen Jorges	e 173, No 2,		5-14,18-3g
	Sequence, and Expression of Pseudomones capacia: Lipas		from	
	HELETE LOGOUS Mosts Regul re-	e Two Demodemans	a Gamesa	
	see discussion pages 565-50	96		
•	WO, A1, 100908 (MOVO MORESISK A, (24.01.91), see page 3 line	(5), 24 January	1991	5-14,18-30
	(24.01.91), see page 3 line	is 16-31 and the	clates	3 14,15-34
1	]			1-4.15-17
Furt	ter decurrents are inted in the consequence of E	es C. Y See po	era formity annual	
	corpores of a unit december			
10 Hz	increases and protected and as ages, the management grant date is not come associated and protected in the company of the part of the part of the company of			managed fitting data or proper seems but made to superment a restore
-	ord which had a throw deleted the process of supply or which of a current the processing day of emiliar colorest or other recent (to sprending)			indict of market and the last to the state of the state o
* earner	ream, (se spreaders) our retering to se erst declarate, use, exhibited or migr	TY' described of part		
	mir-top time in in marketing hind can be the fire			
	actual completion of the atternational search	. 5	r of the rates passed (	esti y
		Date of masting of the	• iMerzauensi se 14- <b>1952</b> 3	eren report
	muning address of the ISA:			
redish	Patent Office	Authoritis officer		
	8-102 42 STOCKHOLM	Yvonne Stästee		
	A.Z IO (record then) (July 1992)	Telephone No. +4	6 F 782 25 00	

	图 集 調 宏 報 告   International applica	
C (Canting	ment DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevent to claim !
A	EP, AZ, 0331378 (AMAND PHARMACELTICAL CO., LTD.), 6 Sept 1989 (06.09.89)	1-36
<b>A</b>	Chemical Abstracts, Volume 111, No 21, 20 November 1989 (20.13.89), (Columbus, Ohio, USA), Ellis R. John et al., "Moleculer chaperones: processin essential for the biogenesis of some Recromolecular structures", nege 254, 116: AbSTRACT No 189547, Trends Stoches. Scf. (Pers. Ed.) 1989, 14 (8), 339-342, (a)	1-30
}		
i		
- 1		
j		
}	•	
- 1		
- 1		
- 1		
- 1	•	
- 1		
1		
-		
1		
j		
- 1	1	
- 1		
- 1		
i		
- 1		
i		
i		
i		
1		
į		
PCT ISA	10 Kontinuation of assert sheet; Usely 1992)	

Q. .

# フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6		識別記号	疗内整理番号	FI
C 1 2 P	19/38		7432 -4B	
//(C12N	15/09	ZNA		
C 1 2 R	1:07)			
(C 1 2 N	1/21			
C 1 2 R	1:19)			
(C 1 2 N	9/20			
C 1 2 R	1:38)			

C 1 2 R 1:07)

(72)発明者 パックレイ、キャサリン エム. アイルランド国、コーク 4. ボーラドフ ロード、ランズケープ パーク "タ ラ" (番地なし) (72)発明者 ホプソン,オードリー アイルランド国,ウィックロウ,アポカ, キルマジグハウス (番地なし)

(72)発明者 マッコンネル,デビッド ジェイ. アイルランド国,ダブリン,ブラックロッ ク,グローブ ロウン 31